

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :

Kai LICHA et al.

Serial No. : Unassigned

Filed : January 23, 2004

For : HYDROPHILIC, THIOL-REACTIVE CYANINE DYES AND CONJUGATES
THEREOF WITH BIOMOLECULES FOR FLUORESCENCE DIAGNOSIS

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

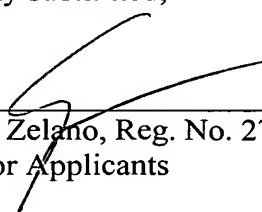
Submitted herewith is a certified copy of each of the below-identified document(s),
benefit of priority of each of which is claimed under 35 U.S.C. § 119:

COUNTRY	APPLICATION NO.	FILING DATE
Germany	103 02 787.4	January 24, 2003

Acknowledgment of the receipt of the above document(s) is requested.

No fee is believed to be due in association with this filing, however, the Commissioner is
hereby authorized to charge fees under 37 C.F.R. §§ 1.16 and 1.17 which may be required to
facilitate this filing, or credit any overpayment to Deposit Account No. 13-3402.

Respectfully submitted,



Anthony J. Zelano, Reg. No. 27,969
Attorney for Applicants

MILLEN, WHITE, ZELANO
& BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Blvd. Suite 1400
Arlington, Virginia 22201
Telephone: (703) 243-6333
Facsimile: (703) 243-6410

Attorney Docket No.: BOEHMER-1

Date: January 23, 2004

K:\BOEHMER\1\Submission of Priority Documents.doc



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 02 787.4

Anmeldetag: 24. Januar 2003

Anmelder/Inhaber: Schering AG, Berlin/DE

Bezeichnung: Hydrophile, Thiol-reaktive Cyaninfarbstoffe und deren Konjugate mit Biomolekülen für die Fluoreszenzdiagnostik

IPC: C 09 B, A 61 K, C 09 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sick'.

Sick

Hydrophile, Thiol-reaktive Cyaninfarbstoffe und deren Konjugate mit Biomolekülen für die Fluoreszenzdiagnostik

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Fluoreszenzfarbstoffe aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe, im speziellen Indotricarbocyanine mit einem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Spektralbereich 700 bis 900 nm, einer Thiol-spezifischen reaktiven Gruppe und drei, vorzugsweise vier Sulfonatgruppen, zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit sowie die Herstellung der Farbstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Konjugate dieser Farbstoffe mit Biomolekülen und deren Verwendungen.

Hintergrund der Erfindung

Die Verwendung von Licht in der medizinischen Diagnostik hat in den letzten Jahren an Stellenwert gewonnen (siehe z. B. Biomedical Photonics Handbook (Editor: T. Vo-Dinh), CRC Press). Eine Vielzahl diagnostischer Verfahren befinden sich in der experimentellen Erprobung für eine Anwendung in diversen medizinischen Disziplinen, z. B. der Endoskopie, Mammographie, Chirurgie oder Gynäkologie. Licht-basierte Verfahren besitzen eine hohe instrumentelle Empfindlichkeit und ermöglichen die molekulare Detektion und Bildgebung geringster Mengen an Chromophoren und/oder Fluorophoren (Weissleder et al. (2001) Molecular Imaging. Radiology 219, 316-333).

Von besonderem Interesse für die *in-vivo*-Anwendung sind daher Farbstoffe, die als exogene Kontrastmittel zur Fluoreszenzdiagnose und -bildgebung dem Gewebe zugeführt werden, und hier insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Spektralbereich von 700 – 900 nm (diagnostisches Fenster von Gewebe). Photonen dieser Wellenlänge werden vergleichsweise wenig von Gewebe absorbiert und können daher mehrere Zentimeter in Gewebe eindringen, bevor der Vorgang der Absorption (vorwiegend durch Oxy- und Desoxyhämoglobin) den Lichttransport beendet. Die Absorption kann darüber hinaus durch in das Gewebe eingebrachte Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen, die aber die absorbierte Energie in Form von längerwelliger Fluoreszenzstrahlung emittieren. Diese Fluoreszenzstrahlung kann spektral separiert detektiert werden und ermöglicht die Lokalisation des Farbstoffs und Korrelation mit molekularen Strukturen, an die der Farbstoff gebunden hat (siehe

hierzu auch Licha K (2002) Contrast agents for optical imaging (Review). In: Topics in Current Chemistry – Contrast Agents II (Editor: W. Krause), Volume 222, Springer Heidelberg, p. 1 – 31.).

Um eine diagnostisch signifikante Differenzierung zwischen erkrankten Strukturen und gesundem Gewebe zu erzielen, muß der zugeführte Farbstoff zu einem möglichst hohen Konzentrationsunterschied zwischen den Geweben führen. Dieses kann aufgrund tumorphysiologischer Eigenschaften (Durchblutung, Verteilungskinetik, verzögerter Abtransport) erfolgen. Zur molekularen Markierung Krankheits-spezifischer Strukturen können Konjugate aus Fluoreszenzfarbstoffen mit Ziel-affinen Biomolekülen, wie Proteine, Peptide, Antikörper, eingesetzt werden. Nach Injektion bindet ein bestimmter Anteil dieser Konjugate an molekulare Zielstrukturen, wie Rezeptoren oder Matrixproteine, während der nicht gebundene Anteil aus dem Körper ausgeschieden wird. Dadurch resultiert ein hoher Konzentrationsunterschied und somit ein hoher Bildkontrast bei der Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik.

Fluoreszenzfarbstoffe aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe gehören zu den vielversprechendsten Vertretern und wurden in vielfältiger struktureller Breite synthetisiert. Insbesondere Carbocyanine mit Indocarbo-, Indodicarbo- und Indotricarbocyaningerüst besitzen hohe Extinktionskoeffizienten und gute Fluoreszenzquantenausbeuten [Licha K (2002) Contrast agents for optical imaging (Review). In: Topics in Current Chemistry – Contrast Agents II (Editor: W. Krause), Volume 222, Springer Heidelberg, p. 1 – 31, und die darin zitierten Referenzen].

So beschreibt die WO 96/17628 ein in-vivo diagnostisches Verfahren mittels naher Infrarot-Strahlung. Dabei werden wasserlösliche Farbstoffe und deren Biomolekül-Addukte mit spezifischen photophysikalischen und pharmakochemischen Eigenschaften, als Kontrastmedien für die Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik.

Die Synthese von Cyaninfarbstoffen mit Indocarbo-, Indodicarbo- und Indotricarbocyaningerüst ist im Stand der Technik gut beschrieben. Dazu einschlägige Literatur ist zum Beispiel: Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993; Bioconjugate Chem. 7, 356-62, 1996; Bioconjugate Chem. 8, 751-56, 1997; Cytometry 10, 11-19, 1989 und 11, 418-30, 1990; J. Heterocycl. Chem. 33, 1871-6, 1996; J. Org. Chem. 60, 2391-5, 1995; Dyes and Pigments 17, 19-27, 1991; Dyes and Pigments 21, 227-34, 1993; J. Fluoresc. 3, 153-155, 1993; und Anal. Biochem. 217, 197-204, 1994. Weitere Verfahren sind in den Patentpublikationen US 4,981,977;

US 5,688,966; US 5,808,044; WO 97/42976; WO 97/42978; WO 98/22146; WO 98/26077; und EP 0 800 831 beschrieben.

Darüber hinaus wurden Indotricarbocyanine mit abgewandelten Substituenten synthetisiert und an Biomoleküle gekoppelt (beschrieben u.a. in Photochem. Photobiol. 72, 234, 2000; Bioconjugate Chem. 12, 44, 2001; Nature Biotechnol. 19, 237, 2001; J. Biomed. Optics 6, 122, 2001; J. Med. Chem. 45, 2003, 2002). Weitere Beispiele finden sich insbesondere in den Veröffentlichungen WO 00/61194 („Short-chain peptide dye conjugates as contrast agents for optical diagnostics“), WO 00/71162, WO 01/52746, WO 01/52743 und WO 01/62156.

Die bisher im Stand der Technik verwendeten bekannten Indotricarbocyanine weisen jedoch immer noch Nachteile auf, die deren effiziente Verwendung beeinträchtigen.

So bestehen immer noch geringe Fluoreszenzquantenausbeuten der Indotricarbocyanine nach einer Kopplung an Biomoleküle. So beschreiben Gruber et al. (Bioconjugate Chem. 11, 696-704, 2000) für den käuflich erhältlichen Farbstoff Cy7, daß nach Kopplung an ein Biomolekül ein Verlust an Fluoreszenzeffizienz auftritt. Becker et al. (Photochem. Photobiol. 72, 234, 2000) beschreiben Konjugate eines Indotricarbocyanins mit HSA und Transferrin mit Fluoreszenzquantenausbeuten von 2,9% bzw. 2,8%, und deformierte Absorptionsspektren in physiologischen Medium.

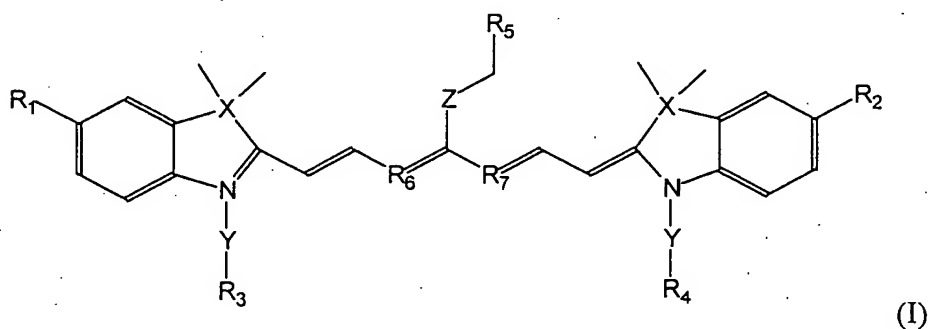
Weiterhin neigen die Farbstoffkonjugate zur Aggregation. So beschreiben Becker et al. (Photochem. Photobiol. 72, 234, 2000) für Konjugate eines Indotricarbocyanins mit HSA und Transferrin, und Licha et al. (Bioconjugate Chem. 12, 44-50, 2001) für Rezeptor-bindende Peptide, daß diese deformierte Absorptionsspektren in physiologischen Medium aufweisen. Diese Deformationen weisen auf Aggregatbildung und dadurch auftretende Fluoreszenzlöschung hin. Ein ähnliches Problem besteht bei einer unzureichenden Wasserlöslichkeit der Farbstoffe.

Auch besteht immer noch ein ineffizienter Zugang zu Derivaten mit einer Reaktivgruppe. So beschreiben Gruber et al. (Bioconjugate Chem. 11, 696-704, 2000) die Verwendung von Cy7-bisfunktionellem NHS-Ester mit zwei Reaktivgruppen, wodurch potentiell kovalente Quervernetzung zweier Biomoleküle erfolgen könnte. Durch zwei Carboxygruppen im Molekül ist jedoch der synthetische Zugang zu Derivaten mit nur einer Reaktivgruppe erschwert und führt

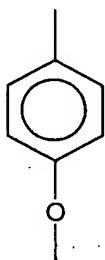
zu Nebenprodukten (z.B. enthält monoreaktiver NHS-Ester von Cy7 Anteile des nicht-aktivierten und des doppelt aktivierten Cy7-Moleküls).

Es besteht somit ein kontinuierlicher Bedarf an effizienten und leicht herzustellenden Cyaninfarbstoffen für die Fluoreszenzdiagnostik, die die oben genannten Nachteile vermindern oder nicht aufweisen. Weiterhin sollten diese Farbstoffe sich gut für die Herstellung von Konjugaten mit Biomolekülen eignen.

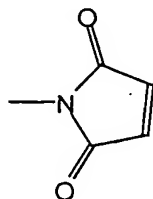
Eine erste Aufgabe der Erfindung wird durch die Bereitstellung eines Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel (I),

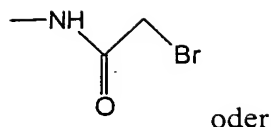


gelöst, worin X O, S oder zweifach substituiertes C ist, wobei die Substituenten ausgewählt sein können aus Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl und/oder Butyl, Y CH₂-CH₂ oder CH₂-CH₂-CH₂ ist, Z C₁ bis C₅ Alkyl ist, wobei die C-Atome gegebenenfalls durch O oder S substituiert sind oder



ist, R₁ bis R₄ unabhängig voneinander SO₃H oder H sind, mit der Voraussetzung, daß mindestens drei von R₁ bis R₄ SO₃H sind, R₅ -CO-NH-R₈-R₉, -NH-CS-NH-R₈-R₉ oder -NH-CO-R₈-R₉ ist, worin R₈ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus unverzweigtem C₂-C₁₃ Alkyl, in dem gegebenenfalls C-Atome durch O oder S ersetzt sind, und R₉ ausgewählt ist aus



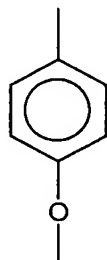


oder Chloracetyl, Bromacetyl, Iodacetyl, Chloracetamido, Iodacetamido, Chloralkyl, Bromalkyl, Iodalkyl, Pyridyldisulfid und Vinylsulfonamid, und worin R_6 und R_7 CH ist oder durch ein C_3 -Alkyl zu einem Hexylring verbunden sind, der gegebenenfalls in para-Position mit einem C_1 bis C_4 -Alkylrest substituiert sein kann, und Salze und Solvate dieser Verbindung.

Bevorzugt ist ein Indotricarbocyaninfarbstoff der vorliegenden Erfindung, worin Y CH_2-CH_2 ist; Z C_1 bis C_5 Alkyl ist, wobei die C-Atome gegebenenfalls durch O oder S substituiert sind, und worin R_6 und R_7 CH ist, und Salze und Solvate dieser Verbindung.

Weiter bevorzugt ist ein Indotricarbocyaninfarbstoff der vorliegenden Erfindung, worin Z C_1 - C_5 Alkyl ist.

Noch weiter bevorzugt ist ein Indotricarbocyaninfarbstoff der vorliegenden Erfindung, worin Z



ist, und R_6 und R_7 über C_3 -Alkyl zu einem Hexylring verbunden ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Fluoreszenzfarbstoffe aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe, insbesondere Indotricarbocyanine mit einem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Spektralbereich 700 bis 900 nm, einer Thiol-spezifischen reaktiven Gruppe und drei, vorzugsweise vier, Sulfonatgruppen. Diese dienen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit.

Überraschenderweise konnte nun gefunden werden, daß die erfindungsgemäßen Indotricarbocyanine mit der oben genannten Struktur (kompakte Position von 3-4 Sulfonatgruppen über Sulfonatoethylreste) eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute von $> 15\%$ besitzen und daß die

Fluoreszenzquantenausbeute nach Kopplung an Biomoleküle annähernd unverändert bleibt (maximaler Verlust auf ca. 10 %). Die Absorptionsspektren der Konjugate zeigen zudem keine Deformation der Farbstoffabsorption im NIR Bereich bei ca. 750 nm. Es ergibt sich somit eine gute Hydrophilie, verminderte Aggregation und erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute gegenüber herkömmlichen Indotricarbocyaninen bzw. Cy7-Derivaten mit weniger als drei Sulfonatgruppen, speziell im Fall von Cy7 und anderen bekannten Strukturen.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt bei der Bereitstellung der erfindungsgemäßen Cyaninfarbstoffe für die Fluoreszenzdiagnostik betrifft solche Derivate, die reaktive funktionelle Gruppen besitzen, um eine kovalente Kopplung an targetspezifische Biomoleküle zu ermöglichen. Geeignete Derivate sind z. B. NHS-Ester und Isothiocyanate (Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993; Bioconjugate Chem. 8, 751-56, 1997), die mit Aminogruppen reagieren, wie zum Beispiel Maleimide, α -Halogenketone oder α -Halogenacetamide (Bioconjugate Chem. 13, 387-391, 2002; Bioconjugate Chem. 11, 161-166, 2000), die mit Thiolgruppen reagieren. Weitere bifunktionelle Linker können aus der Gruppe, umfassend Arylendii-sothiocyanat, Alkylendiisothiocyanat, bis-N-Hydroxy-succinimidylestern, Hexamethylendii-socyanat und N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimidester stammen.

Die WO 01/77229 beschreibt Cyaninfarbstoffe mit einer Kombination von Sulfoarylgruppen, Alkylsubstituenten in *meso*-Position der Methinkette und mindestens einer reaktiven Gruppe, die die Bindung an Biomoleküle ermöglicht. Die Ausführungsbeispiele betreffen jedoch Indodicarbocyanine (Polymethinkette aus 5 C-Atomen), und die Verbindungen besitzen keine Reaktivgruppe in der *meso*-Position.

Die WO 00/16810 („Near infrared fluorescent contrast agent and fluorescence imaging“) beschreibt Indotricarbocyanine, u.a. mit Substituenten in der *meso*-Position der C7-Polymethinkette. Es ist jedoch nicht ableitbar, wie Reaktivgruppen eingeführt oder erzeugt werden können.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Indotricarbocyaninfarbstoff, worin R_5 COOH oder NH_2 ist.

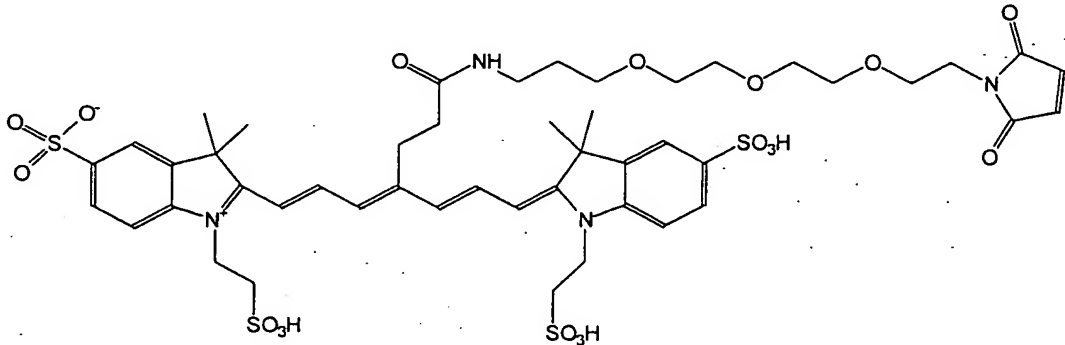
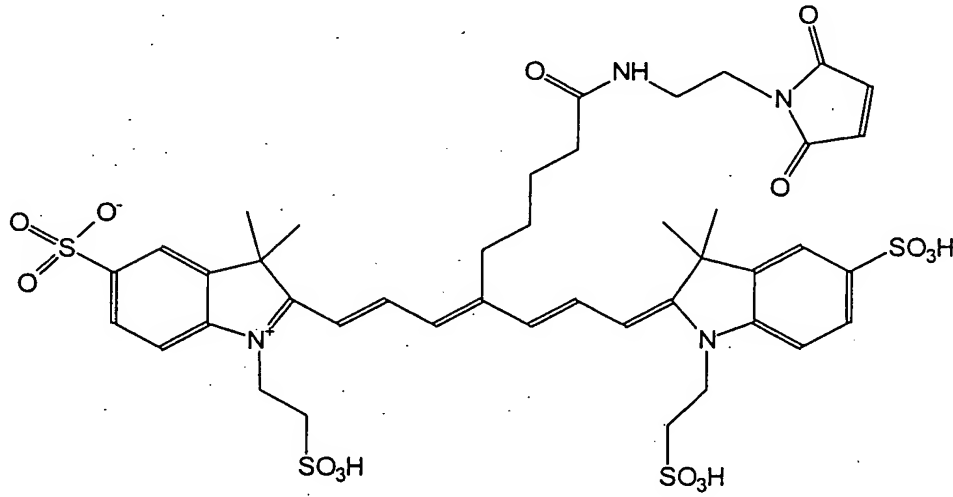
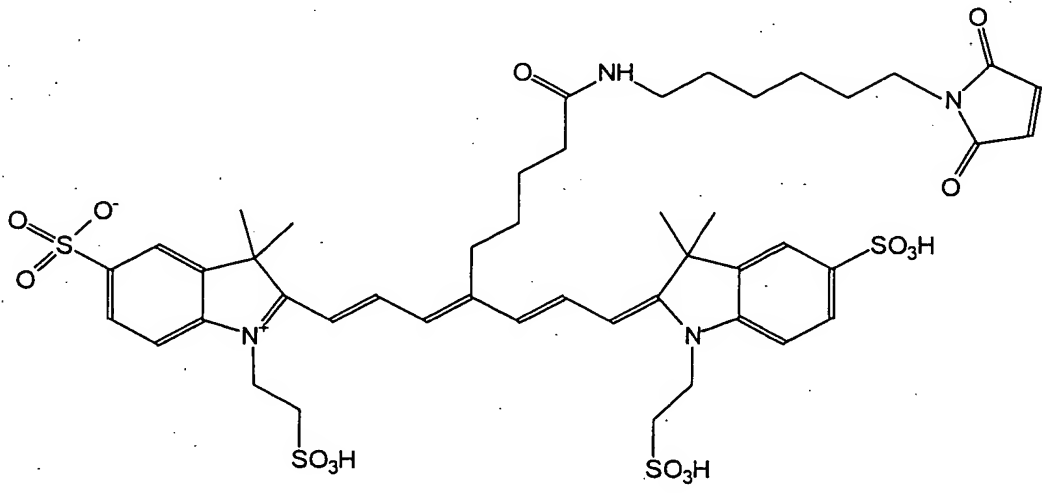
Die publizierten Derivate basieren überwiegend auf der Cy3-, Cy5-, Cy5.5- und Cy7-Grundstruktur (käufllich bei Amersham Pharmacia Biotech; US 5,268,486; Cy3 = Indocarbo-,

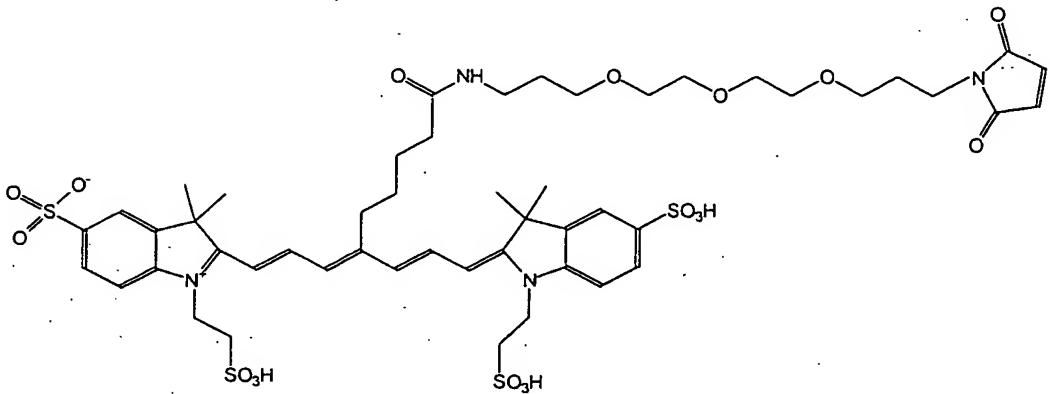
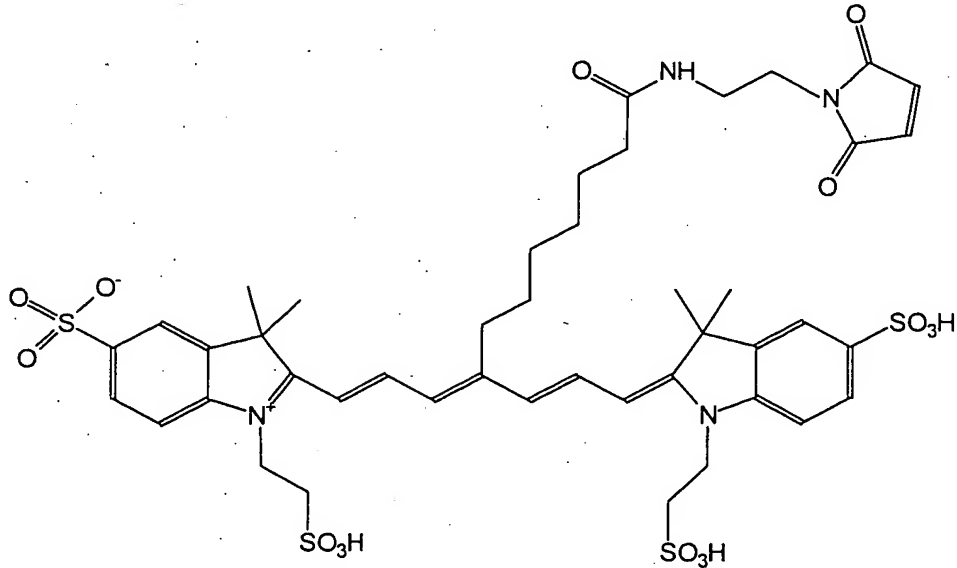
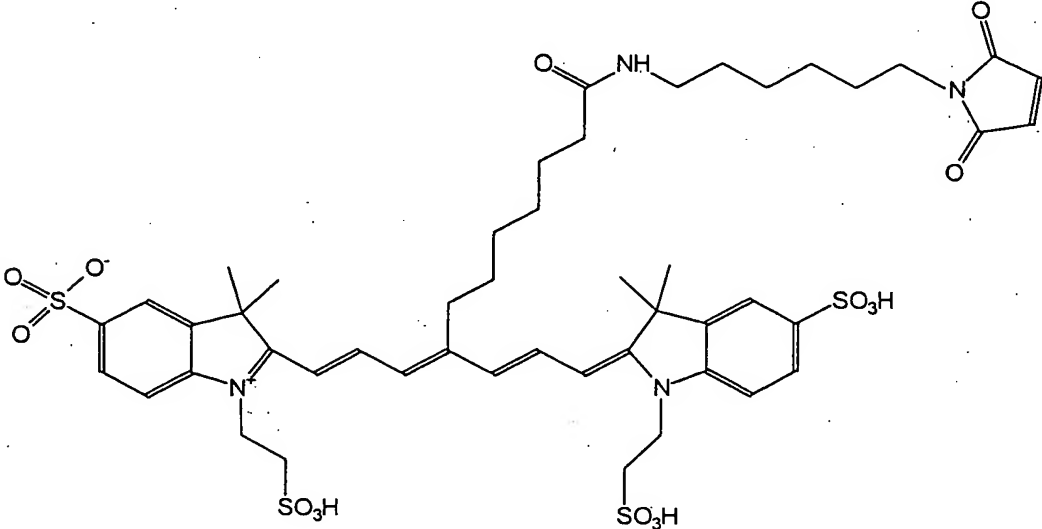
Cy5=Indodicarbo-, Cy7=Indotricarbocyanin). Thiolgruppen-reaktive Derivate sind von besonderem Interesse, da diese eine gerichtete Konjugation mit biotechnologisch gezielt positionierten Cysteinen in Biomolekülen erlauben. Der Stand der Technik konzentriert sich hier überwiegend auf Cy3 und Cy5-Derivate.

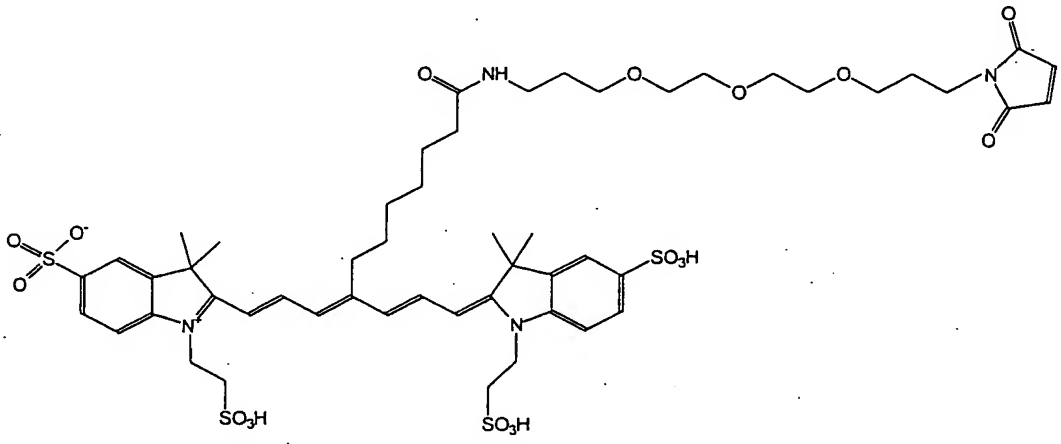
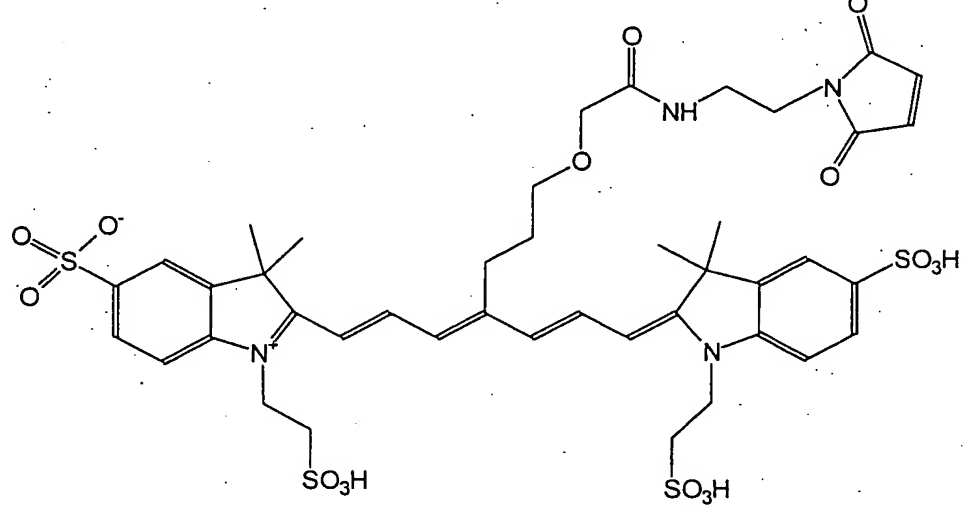
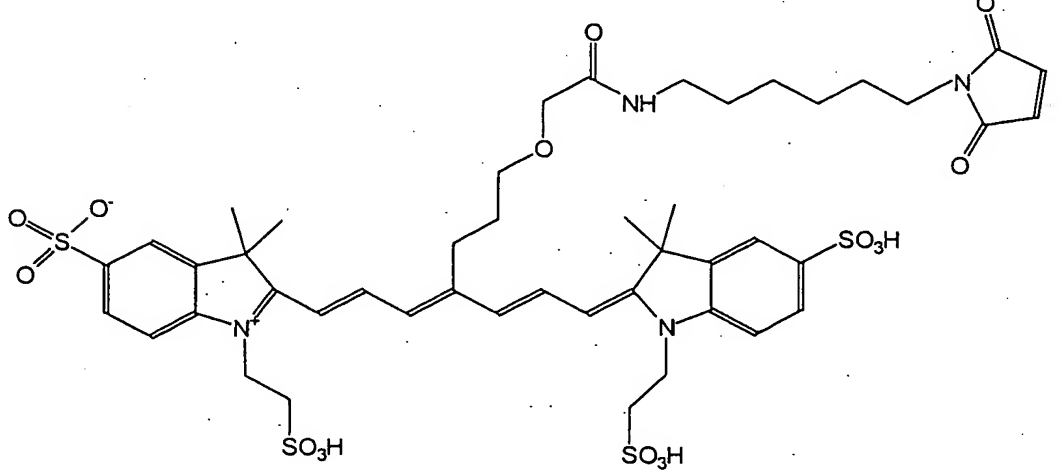
Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Indotricarbocyaninfarbstoffe sind ausgewählt aus den Farbstoffen mit den Formeln (II) bis (XX), die in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet sind:

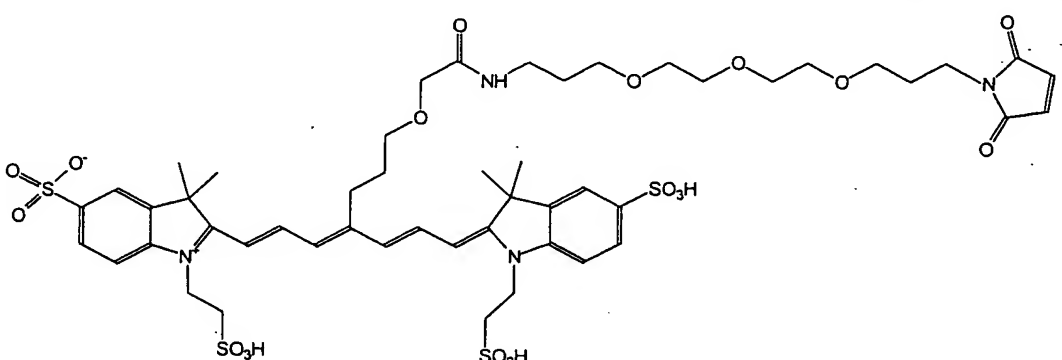
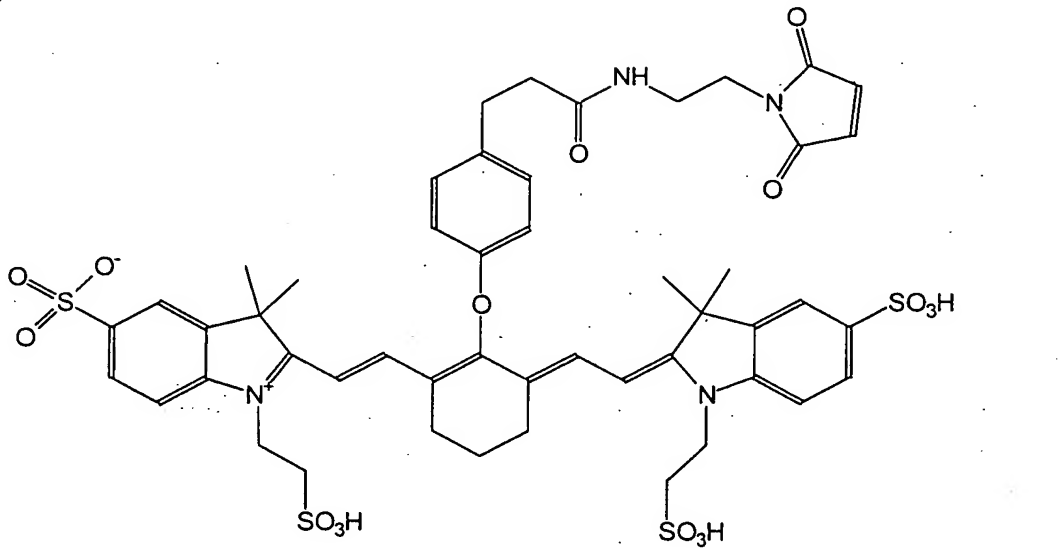
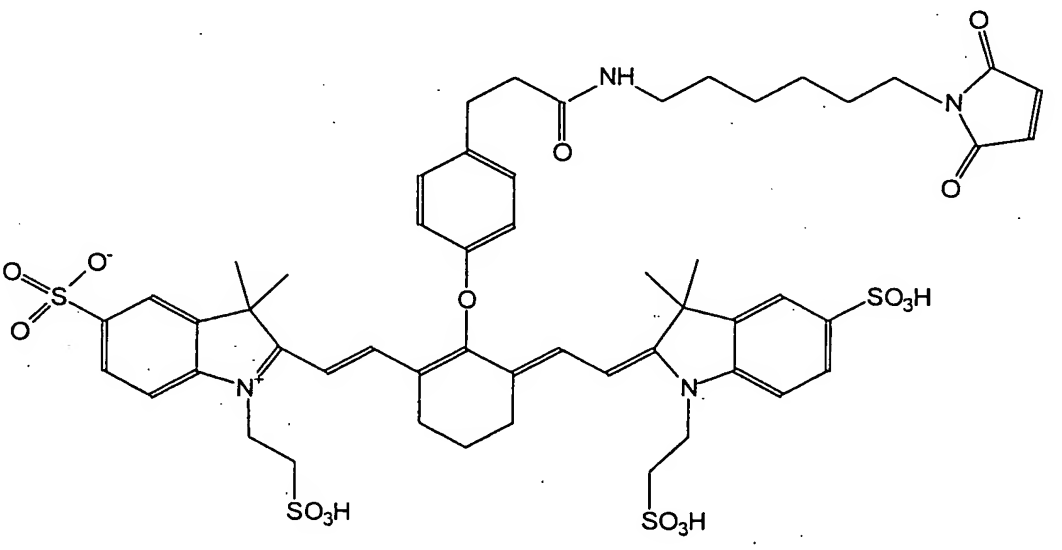
Tabelle 1: Bevorzugte erfindungsgemäße Farbstoffe

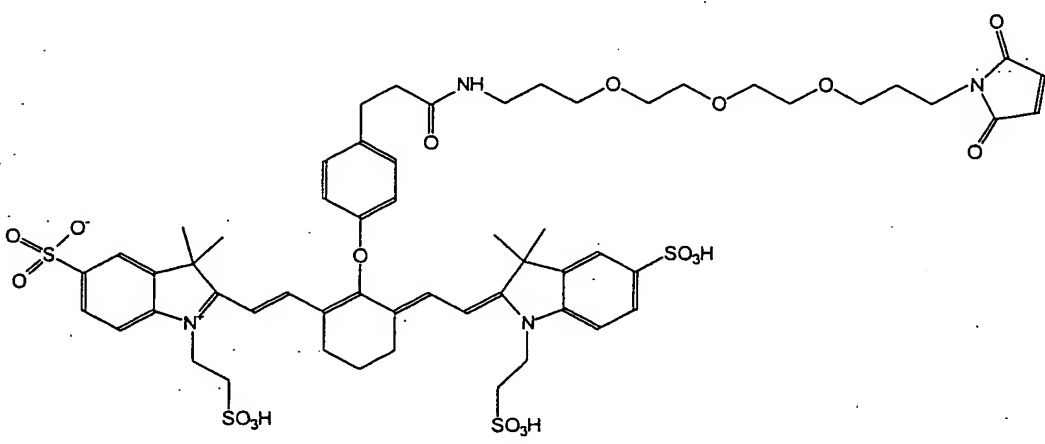
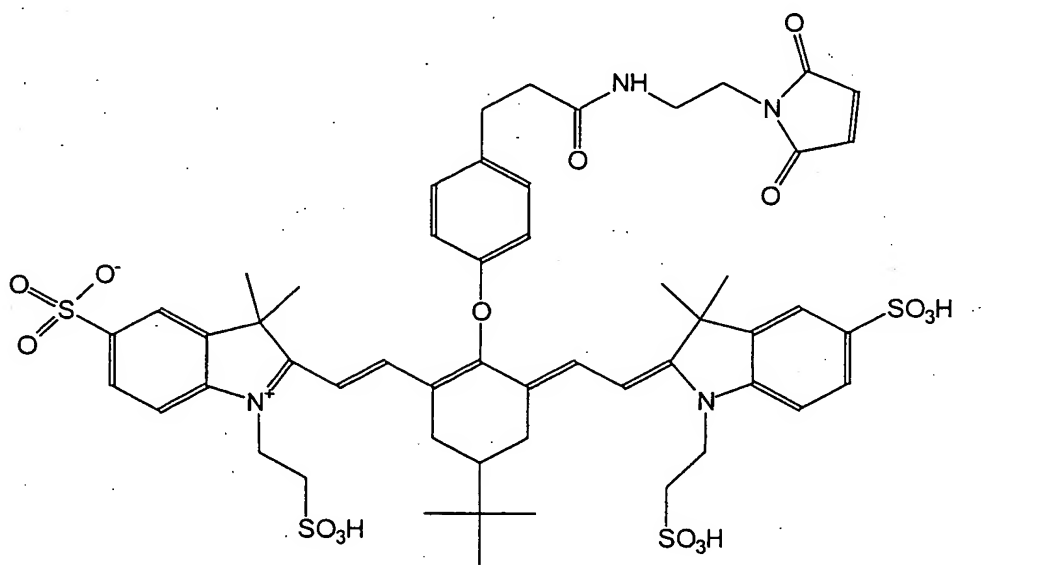
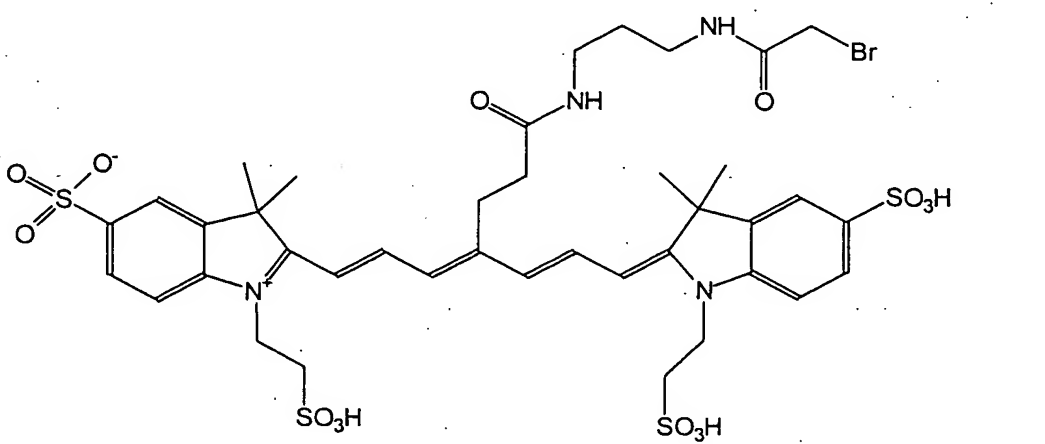
Formel	
(II) Beispiel 1	<p>The chemical structure (II) represents a bis-indole derivative. It features two indole rings connected by a long, conjugated polyene chain. The left indole ring is substituted with a sulfonate group (SO₃⁻) at the 6-position and a 2-(2-sulfonylethyl) group at the 3-position. The right indole ring is substituted with a sulfonic acid group (SO₃H) at the 6-position and a 2-(2-sulfonylethyl) group at the 3-position. The polyene chain is a heptaene system, with a central amide linkage (-NH-) connecting the two indole systems. The amide group is part of a 5-membered ring structure, likely a succinimide derivative, which is further substituted with a methyl group.</p>
(III) Beispiel 2	<p>The chemical structure (III) represents another bis-indole derivative. It features two indole rings connected by a long, conjugated polyene chain. The left indole ring is substituted with a sulfonate group (SO₃⁻) at the 6-position and a 2-(2-sulfonylethyl) group at the 3-position. The right indole ring is substituted with a sulfonic acid group (SO₃H) at the 6-position and a 2-(2-sulfonylethyl) group at the 3-position. The polyene chain is a heptaene system, with a central amide linkage (-NH-) connecting the two indole systems. The amide group is part of a 5-membered ring structure, likely a succinimide derivative, which is further substituted with a methyl group.</p>

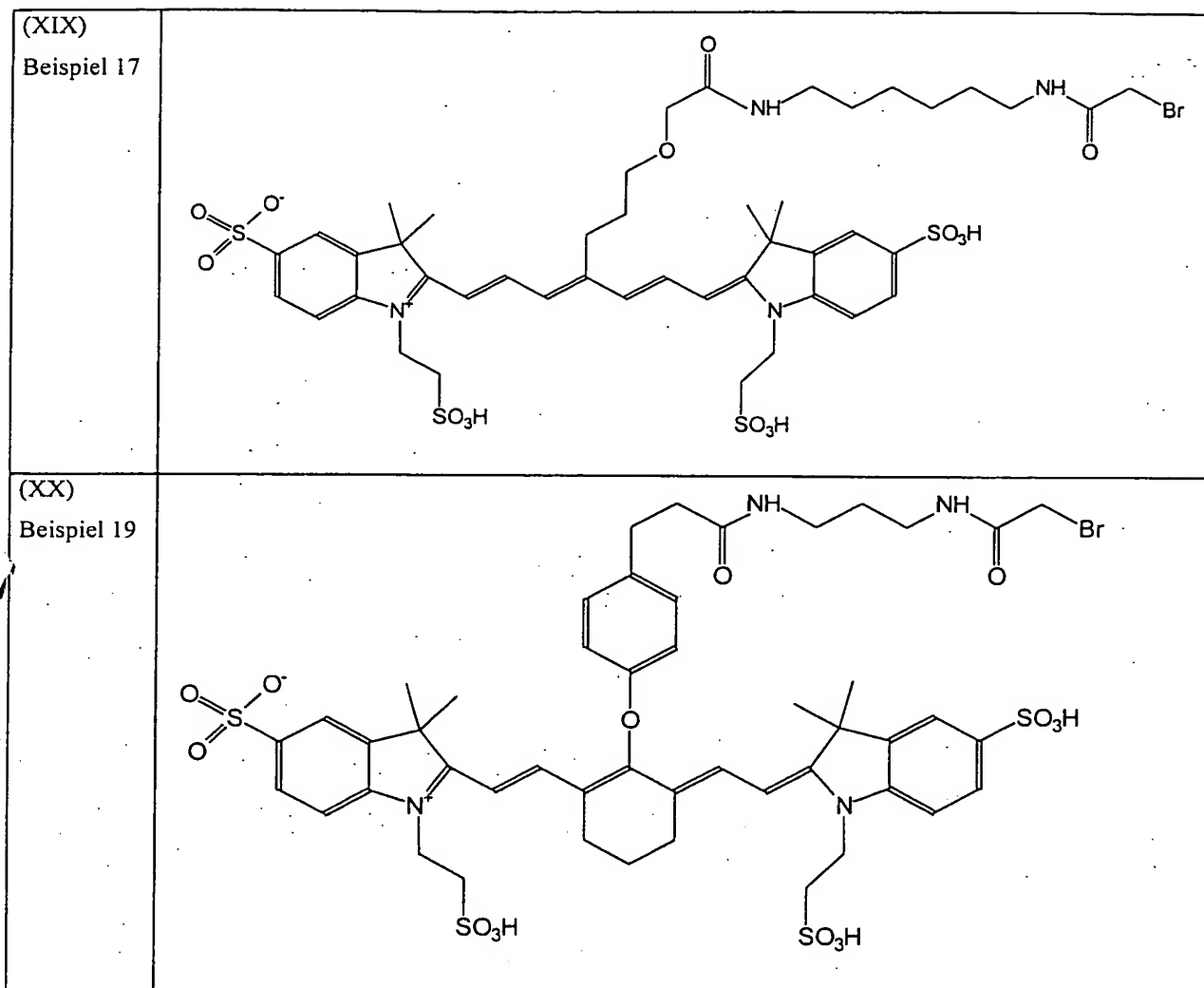
<p>(IV) Beispiel 3</p>	
<p>(V) Beispiel 4</p>	
<p>(VI) Beispiel 5</p>	

<p>(VII) Beispiel 6</p>	
<p>(VIII) Beispiel 7</p>	
<p>(IX) Beispiel 8</p>	

<p>(X) Beispiel 9</p>	
<p>(XI) Beispiel 10</p>	
<p>(XII) Beispiel 11</p>	

<p>(XIII) Beispiel 12</p>	
<p>(XIV) Beispiel 13</p>	
<p>(XV) Beispiel 14</p>	

<p>(XVI) Beispiel 15</p>	
<p>(XVII) Beispiel 16</p>	
<p>(XVIII) Beispiel 18</p>	



Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Indotricarbocyaninfarbstoffs der vorliegenden Erfindung. Dabei wurde ein einfacher Zugang über 4-substituierte Pyridine gefunden. Überraschenderweise konnten verschiedene 4-substituierte Pyridine in hohen Ausbeuten mittels der Zincke-Reaktion (Zincke-König-Reaktion, siehe Römpps Chemie-Lexikon, 10. Auflage, Seite 5067) in *meso*-substituierte Glutaconaldehyd-dianilide (Vorstufe zu Cyaninfarbstoff) überführt werden.

Die symmetrische Struktur der Farbstoffe der vorliegenden Erfindung eröffnet zusätzlich zu der einfachen und effizienten Synthese aus 4-substituierten Pyridinen die Möglichkeit einer definierten Derivatisierung mit einer Thiolgruppen-selektiven Reaktivgruppe in symmetrischer *meso*-Position des Moleküls.

So erfolgte die weitere Derivatisierung zu Thiolgruppen-reaktiven Verbindungen. Thiolgruppen-reaktive Funktionalitäten sind z. B. Maleinimid (Maleimid), Chloracetyl, Bromacetyl, Iodacetyl, Chloracetamido, Bromacetamido, Iodacetamido, Chloralkyl, Bromalkyl, Iodalkyl, Pyridyldisulfid und Vinylsulfonamid.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugats, umfassend Koppeln eines Indotricarbocyaninfarbstoffs der vorliegenden Erfindung mit einem Biomolekül. Unter „Biomolekül“ soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung jedes Molekül biologischen Ursprungs verstanden werden, das eine biologische Aktivität aufweist, insbesondere enzymatische Aktivität oder Bindung von Substanzen synthetischen oder biologischen Ursprungs, wie zum Beispiel Pharmaka, Peptide, Proteine, Rezeptoren oder Nukleinsäuren. Bevorzugte Biomoleküle sind ihrerseits Proteine, wie etwa Enzyme, Peptide, Antikörper und Antikörperfragmente (wie z.B. single chain, Fab, F(ab)₂, diabodies, usw.), Lipoproteine, Nukleinsäuren, wie zum Beispiel Oligo- oder Polynukleotiden aus DNA oder RNA, Aptamere, PNA, und Zucker, wie zum Beispiel Mono-, Di-, Tri-, Oligo- und Polysaccharide.

Die Synthese und biologische Charakterisierung von Cyaninfarbstoff-Konjugaten mit Biomolekülen, wie Peptiden, Antikörpern und Fragmenten davon und Proteinen für die *in vivo* Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren ist im Stand der Technik in diversen Publikationen beschrieben. Dabei wurden überwiegend die o. g. Cy3, Cy5, Cy5.5 und Cy7 verwendet (siehe dazu u.a. Nature Biotechnol. 15, 1271, 1997; Cancer Detect. Prev. 22, 251, 1998; J. Immunol. Meth. 231, 239, 1999; Nature Biotechnol. 17, 375, 1999; Nature Medicine 7, 743, 2001).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Konjugat eines erfindungsgemäßen Indotricarbocyaninfarbstoffs mit einem Biomolekül, das nach einem Verfahren der Erfindung hergestellt wurde. Dieses Konjugat kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es ein wie oben definiertes Biomolekül umfaßt, wobei als Biomolekül mindestens ein Biomolekül, ausgewählt aus Peptiden, Proteinen, Lipoproteinen, Antikörpern oder Antikörperfragmenten, Nukleinsäuren, wie zum Beispiel Oligo- oder Polynukleotiden aus DNA oder RNA, Aptameren, PNA, und Zuckern, wie zum Beispiel Mono-, Di-, Tri-, Oligo- und Polysacchariden weiter bevorzugt ist. So kann das gekoppelte Protein dadurch gekennzeichnet sein, daß es ausgewählt aus ist der Gruppe von Strukturproteinen oder löslichen Proteinen des Körpers. Ganz besonders bevorzugt sind Serumproteine (z. B. HSA), Antikörper / Antikörperfragmente, wie

z.B. ein scFv-Fragment oder F(ab) sowie daraus abgeleitete Peptide, BSA, Ovalbumin oder eine Peroxidase.

So sind z.B. aus dem Stand der Technik bereits Antikörper bekannt, die gegen Moleküle gerichtet sind, die im angiogenetisch aktiven Gewebe stark und im angrenzenden Gewebe nur auf sehr geringem Niveau exprimiert sind (siehe WO 96/01653). Von besonderen Interesse sind Antikörper, die gegen die Rezeptoren für vaskuläre Wachstumsfaktoren, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Entzündungsmediatoren binden, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Matrixmoleküle binden und Matrixproteine, die spezifisch bei der Gefäßneubildung exprimiert werden. Bevorzugt sind weiter Antikörper oder Antikörperfragmente, die gegen das Matrixprotein EDB-Fibronectin gerichtet sind und erfindungsgemäße Konjugate daraus. EDB-Fibronectin, auch als onkofetales Fibronectin bekannt, ist eine Splicevariante des Fibronectins, das sich spezifisch um neugebildete Gefäße im Prozeß der Angiogenese bildet. Besonders bevorzugt sind die Antikörper L19, E8, AP38 und AP39 gegen das EDB-Fibronectin (Cancer Res 1999, 59, 347; J Immunol Meth 1999, 231, 239; Protein Expr Purif 2001, 21, 156).

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Konjugat, daß dadurch gekennzeichnet ist, daß der Indotricarbocyaninfarbstoff über eine SH-Gruppe, insbesondere über eine SH-Gruppe an einem Cystein, an das Biomolekül gekoppelt vorliegt. Hieraus ergeben sich ggf. noch bevorzugt solche Antikörper und deren Fragmente, die durch rekombinante Techniken so hergestellt sind, daß sie am C-Terminus oder am N-Terminus (innerhalb der äußeren 1-10 Aminosäuren) ein Cystein enthalten, das keine intramolekularen S-S-Brücken bildet und daher für die Kopplung an die erfindungsgemäßen Farbstoffe genutzt werden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, der einen Indotricarbocyaninfarbstoff der vorliegenden Erfindung und/oder ein Konjugat der vorliegenden Erfindung umfaßt. Zusätzlich kann der Kit weitere Hilfsmittel zur Durchführung einer *in vivo* Diagnostik von insbesondere Tumoren enthalten. Diese Hilfsmittel sind zum Beispiel geeignete Puffer, Gefäße, Nachweisreagenzien oder Gebrauchsanweisungen. Bevorzugterweise enthält der Kit alle Materialien für eine intravenöse Applikation der erfindungsgemäßen Farbstoffe. Besondere Ausführungsformen solcher erfindungsgemäßen Kits sind zum Beispiel wie folgt.

Ein erstes Gefäß, das Antikörper (Biomolekül) mit freier SH-Gruppe und gängigen Puffern/Zusätzen enthält, entweder als Lösung oder gefriergetrocknetes Material. Ein weiteres Gefäß, das die erfindungsgemäßen Farbstoffe als Lösung (übliche Zusätze) oder gefriergetrocknetes Material in einem molaren Verhältnis von 0,1 bis 1 (10-facher Unterschub bis äquimolare Menge) enthält. Das Farbstoff-enthaltende Gefäß wird gegebenenfalls mit Puffer oder destilliertem Wasser versetzt und zum Biomolekül-enthaltenden Gefäß hinzugefügt, 1-10 min inkubiert und direkt als Injektionslösung verwendet.

In einer anderen Ausführungsform liegt der Kit in einem Zweikammersystem vor (z.B. einer Spritze), das in einer Kammer die Antikörperlösung und über eine zerstörbare Wand räumlich getrennt in einer zweiten Kammer den Farbstoff als Lösung oder festes Material enthält. Nach Brechen der Wand erfolgt eine Mischung und Erzeugung der Injektionslösung.

Ein letzter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung eines erfindungsgemäßen Konjugats als Fluoreszenzkontrastmittel für die *in vivo* Diagnostik von Tumoren. Das Absorptionsmaximum von Cy7 liegt hierbei im Bereich von 745nm und ist somit besonders geeignet für die *in vivo* Detektion von Fluoreszenz aus tieferen Gewebeschichten (siehe oben). Cy7-Derivate mit Thiolgruppen-selektiven Reaktivgruppen sind bisher jedoch nicht beschrieben. Weiterhin ist die Verwendung von Antikörperkonjugaten zur Detektion von Tumorrandbereichen bereits in der WO 01/23005 (Antibody dye conjugates for binding to target structures of angiogenesis in order to intraoperatively depict tumor peripheries) beschrieben, jedoch nicht unter Verwendung der vorteilhaften erfindungsgemäßen Farbstoffe.

Die Erfindung soll nun weiter in Bezug auf die folgenden Beispiele und Figuren beschrieben werden, ohne jedoch darauf beschränkt zu werden.

Figur 1 zeigt das normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Konjugat K11 (A) und K15 (B) (siehe Tabelle 2) in PBS, und

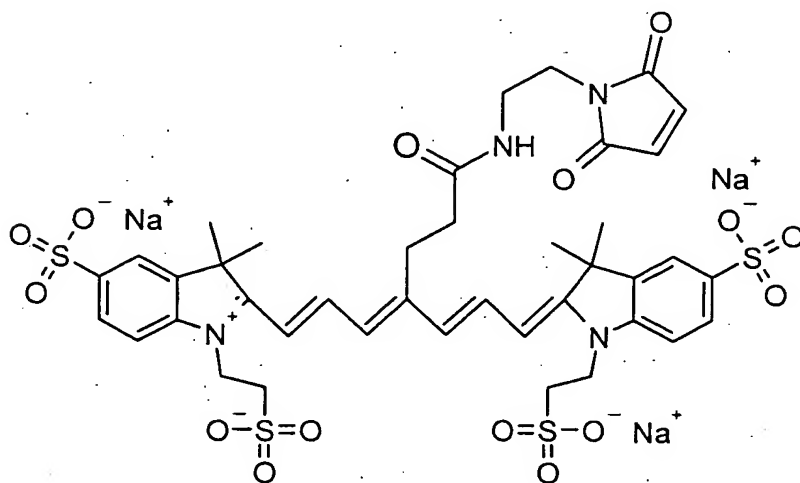
Figur 2 zeigt die Ergebnisse die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Konjugate nach Beispiel 24 mit: Substanz: Konjugat K15; Tumor: F9 Teratokarzinom in der rechten Hinterflanke der Maus; Dosis: 50 nMol/kg Körpergewicht (Angaben bezogen auf Farbstoff); Anregung: 740 nm (Diodenlaser); Detektion: CCD-Kamera (Hamamatsu) mit Bandpassfilter

802,5 \pm 5 nm und den Zeitpunkten: Vor Injektion und 1h, 6h und 24h nach Injektion. Die Position des Tumors ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Beispiele

Beispiele 1 –16: Synthese von Indotricarbocyaninfarbstoffen mit Maleimidgruppen

Beispiel 1: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}ethyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel II)



a) 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure, inneres Salz
10 g (0,04 Mol) 2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (*Bioconjugate Chem* 1993, 4, 105), 6,8 g (0,04 Mol) 2-Chlorethansulfonsäurechlorid und 4,2 g (0,04 Mol) Triethylamin werden in 200 ml Acetonitril 6h unter Rückfluß erhitzt. Der Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet. Ausbeute 5,0 g (35 % d. Th.). *Anal Biochem* 1994, 217, 197

b) 3-Pyridin-4-yl-propionsäure-*tert*-butylester

20 g (89 mMol) *t*-Butyl-P,P-dimethylposphonoacetat in 50 ml THF werden bei 0°C zu einer Suspension von 3,9 g (98 mMol) Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) in 250 ml THF getropft. Nach 1 h Rühren bei 0°C wird eine Lösung von 10 g (93 mMol) Pyridin-4-carbaldehyd in 50 ml Tetrahydrofuran zugetropft und das Reaktionsgemisch 1h bei 0°C und 18 h bei Raumtemp. gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird durch Filtration entfernt und die Lösung eingengt. Der Rückstand wird in der Hitze in Isopropanol gelöst, nicht lösliche Anteile abfiltriert und

die Lösung zur Kristallisation auf 0°C gekühlt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert, mit Hexan verrührt, filtriert und getrocknet. Das Zwischenprodukt (15,3 g) wird in 150 ml Ethanol mit 0,15 g 10 % Palladium/Aktivkohle 6h hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, die Lösung eingengt und der Rückstand über Kieselgel filtriert (Laufmittel Diethylether). Man erhält 13,0 g eines hellgelben Öls (71% d. Th.)

c) 3-[2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid

Eine Lösung von 10 g (48 mMol) 3-Pyridin-4-yl-propionsäure-*tert*-butylester in 150 ml Diethylether wird mit 8,9 g (96 mMol) Anilin versetzt, und anschließend bei 0°C mit einer Lösung von 5,4 g (48 mMol) Bromcyan in 20 ml Diethylether versetzt. Nach 3h Rühren bei 0°C wird der entstandene rote Feststoff abfiltriert, mit Ether gewaschen und vakuumgetrocknet. Ausbeute: 20,3 g (92% d. Th.).

d) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(2-carboxyethyl) hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Eine Suspension von 1,0 g (2,2 mMol) 3-[2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid (Beispiel 1c)) und 1,5 g (4,4 mMol) 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (Beispiel 1a)) in 20 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml Essigsäure wird mit 0,75 g (9,1 mMol) Natriumacetat versetzt und 1h bei 120°C gerührt. Nach Abkühlen wird mit Diethylether versetzt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und chromatographisch gereinigt (RP-C18-Kieselgel, Laufmittel Wasser/Methanol) und das Produkt gefriergetrocknet (0,5 g). Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt durch Rühren des Zwischenproduktes in 4 ml Dichlormethan / 1 ml Trifluoressigsäure für 1h. Nach Einengen, chromatographischer Reinigung (RP-C18-Kieselgel, Laufmittel Wasser/Methanol) erhält man 0,45 g (23 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

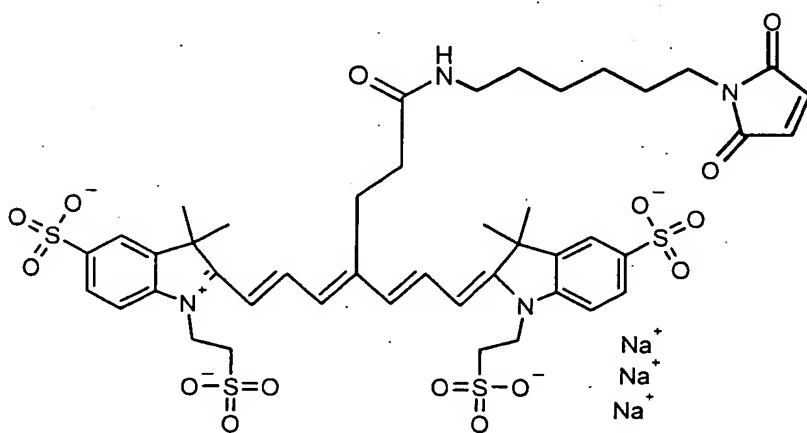
e) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}ethyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

0,4 g (0,45 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 1d) und 45 mg (0,45 mMol) Triethylamin werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst, bei 0°C mit 0,15 g (0,45 mMol) TBTU versetzt und 10 min gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 0,17 g (0,68 mMol) N-(2-

Aminoethyl)maleimid-trifluoracetat (*Int J Pept Protein Res* 1992, 40, 445) und 68 mg (0,68 mMol) Triethylamin in 0,5 ml Dimethylformamid zugegeben und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 10 ml Diethylether wird der Feststoff abzentrifugiert, getrocknet und mittels Chromatographie gereinigt (RP C-18 Kieselgel, Gradient Methanol/Wasser). Ausbeute: 0,30 g eines blauen Lyophilisats (65 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 47,24 H 4,26 N 5,51 S 12,61 Na 6,78
 gef.: C 47,74 H 4,47 N 5,40 S 11,99 Na 7,02

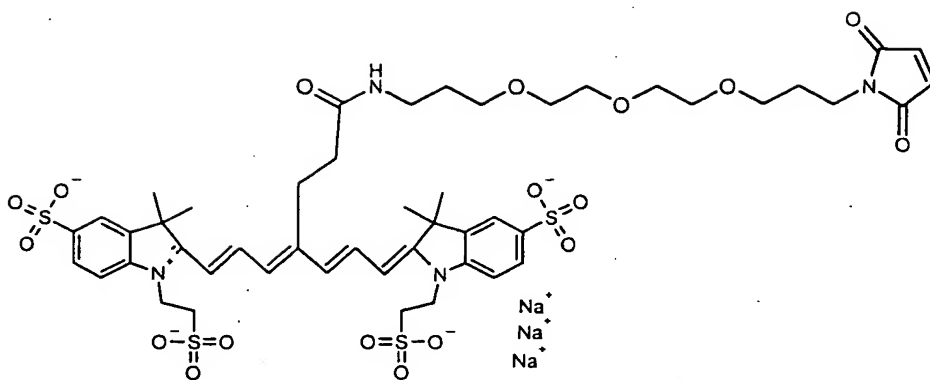
Beispiel 2: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(2-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]carbamoyl}ethyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel III)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,45 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 1d) und 0,21 g (0,68 mMol) N-(6-Aminohexyl)maleimid-trifluoracetat (*Int J Pept Protein Res* 1992, 40, 445). Ausbeute: 0,38 g eines blauen Lyophilisats (81 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 49,25 H 4,79 N 5,22 S 11,95 Na 6,43
 gef.: C 48,96 H 4,92 N 5,32 S 11,88 Na 6,56

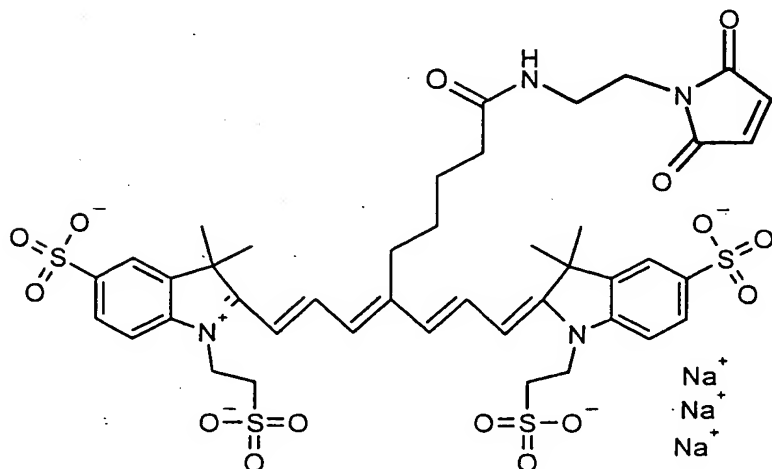
Beispiel 3: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(2-{[13-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,10-trioxatridecyl]carbamoyl}ethyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel IV)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,45 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 1d) und 0,28 g (0,68 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-trifluoracetat (*Int J Pept Protein Res* 1992, 40, 445). Ausbeute: 0,27 g eines blauen Lyophilisats (51 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 48,97 H 5,05 N 4,76 S 10,89 Na 5,86
 gef.: C 49,22 H 5,16 N 4,62 S 10,67 Na 5,66

Beispiel 4: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(4-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbonyl}butyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel V)



a) (3-*tert*-Butoxycarbonyl-propyl)-triphenyl-phosphoniumbromid

50 g (0,30 Mol) 4-Brombuttersäure werden in 400 ml THF bei -40 °C tropfenweise mit 187 g (0,89 Mol) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Nach 30 min Rühren bei -40 °C werden 400

ml tert-Butanol / 30 ml THF innerhalb von 1h zugetropft. Nach 16h Rühren bei Raumtemp. wird das Reaktionsgemisch auf eine eiskalte Natriumcarbonatlösung gegossen, die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert und die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird im Vakuum destilliert (Kp. 72 °C / 0.9 mbar; Ausbeute: 41 g). Die Umsetzung zum Phosphoniumsalz erfolgt Erhitzen von 41 g (0,18 Mol) des Zwischenproduktes, 44,6 g (0,17 Mol) Triphenylphosphin und 32,5 g (0,36 Mol) Natriumhydrogencarbonat in 250 ml Acetonitril für 20h unter Rückfluß. Das Reaktionsgemisch wird filtriert, eingeeengt und der Rückstand durch Verrühren mit Diethylether zur Kristallisation gebracht. Ausbeute: 58,5 g (40 % d. Th., bezogen auf 4-Brombuttersäure) eines weißen Feststoffes.

b) 5-Pyridin-4-yl-pentansäure-t-butylester

Eine Lösung von 14 g (28 mMol) (3-*tert*-Butoxycarbonyl-propyl)-triphenylphosphoniumbromid (Beispiel 4a) in 100 ml wasserfreiem THF wird bei -40 °C unter Luftausschluß innerhalb von 20 min mit 17,5 ml (28 mMol) Butyllithium (1,6 M in Hexan) versetzt und 1h bei -40 °C gerührt. Es wird eine Lösung 2,78 g (26 mMol) 4-Pyridincarbaldehyd in 20 ml THF zugetropft und 16h bei Raumtemp. gerührt, anschließend auf Eiswasser gegossen, die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert und die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel, Laufmittel Hexan/Ethylacetat) erhält man das Produkt als E,Z-Gemisch (4:1 nach ¹H-NMR; 5,0 g). Zur Hydrierung der Doppelbindung wird das Zwischenprodukt in 200 ml Methanol gelöst und mit 100 mg PtO₂-Katalysator bei Raumtemp. über Wasserstoff gerührt. Nach Filtration und Einengen erhält man ein gelbes Öl. Ausbeute: 4,9 g (74 % d. Th.).

c) 3-[4-(*tert*-Butyloxycarbonyl)butyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid

Eine Lösung von 4,0 g (17 mMol) 5-Pyridin-4-yl-pentansäure-t-butylester in 35 ml Diethylether wird mit 3,2 g (34 mMol) Anilin und anschließend bei 0°C mit einer Lösung von 1,9 g (17 mMol) Bromcyan in 8 ml Diethylether versetzt. Nach 3 h Rühren bei 0°C wird der entstandene rote Feststoff abfiltriert, mit Ether gewaschen und vakuumgetrocknet. Ausbeute: 7,8 g (95 % d. Th.).

d) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(4-carboxybutyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

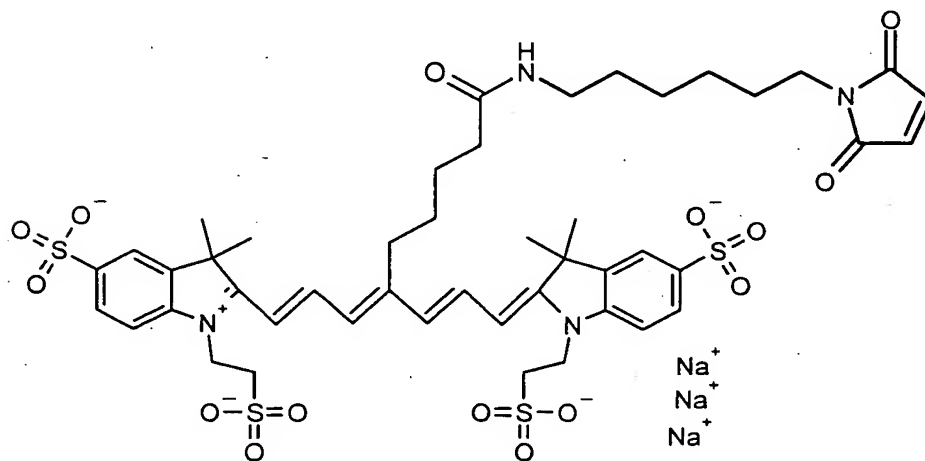
Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1d) aus der Titelverbindung von Beispiel 4c) (2,5 mMol) und 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (5 mMol). Ausbeute: 0,85 g (37 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

e) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(4-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}butyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,43 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 4d). Ausbeute: 0,31 g (69 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

Elementaranalyse: ber.: C 48,27 H 4,53 N 5,36 S 12,27 Na 6,60
gef.: C 48,01 H 4,44 N 5,56 S 12,10 Na 6,81

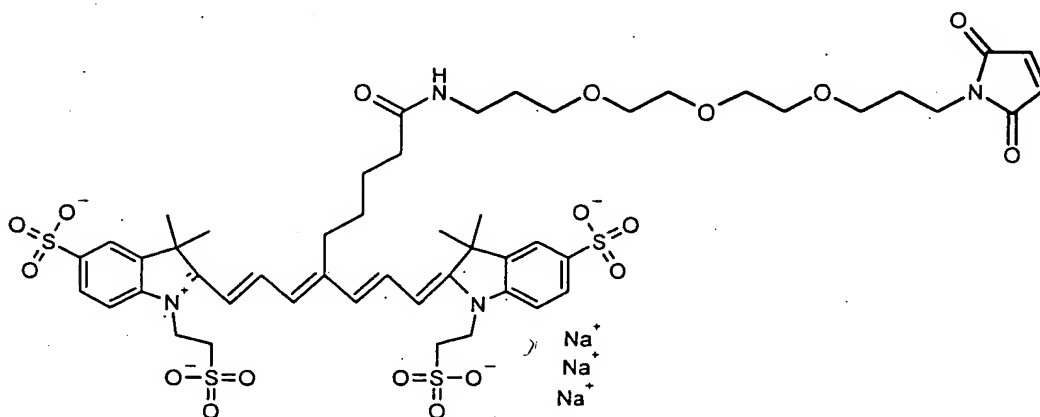
Beispiel 5: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(4-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]carbamoyl}butyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel VI)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,43 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 4d) und 0,20 g (0,66 mMol) N-(6-Aminohexyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,35 g eines blauen Lyophilisats (74 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 50,17 H 5,03 N 5,09 S 11,65 Na 6,26
gef.: C 49,83 H 4,89 N 5,34 S 12,05 Na 6,42

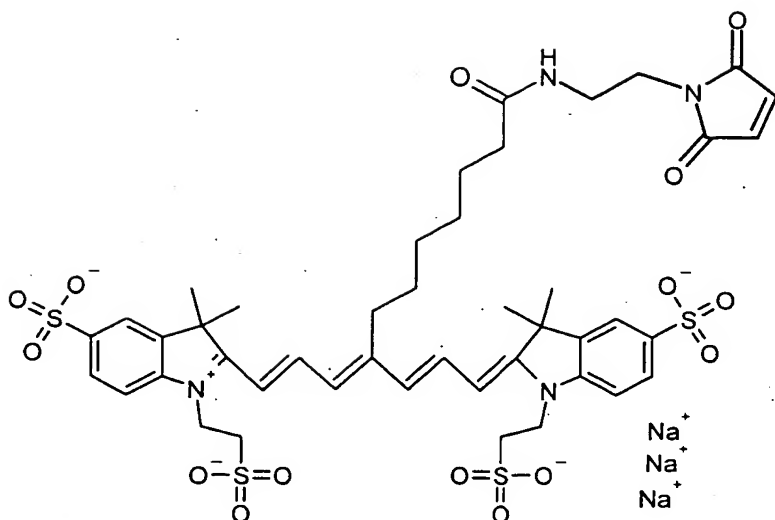
Beispiel 6: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(4-{[13-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,10-trioxatridecyl]carbamoyl}butyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel VII)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,43 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 1d) und 0,30 g (0,72 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,27 g eines blauen Lyophilisats (52 % d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.:	C 49,83	H 5,27	N 4,65	S 10,64	Na 5,72
	gef.:	C 49,45	H 5,19	N 4,66	S 10,85	Na 5,80

Beispiel 7: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}hexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel VIII)



a) (3-*tert*-Butoxycarbonyl-pentyl)-triphenyl-phosphoniumbromid

Die Darstellung erfolgt wie in Beispiel 4a) beschrieben, wobei das Zwischenprodukt 6-Bromhexansäure-*tert*-butylester als Rohprodukt umgesetzt wird. Aus 50 g 6-Bromhexansäure erhält man 79 g Produkt (69 % d. Th.) als zähes, farbloses Öl.

b) 7-Pyridin-4-yl-heptansäure-*t*-butylester

Die Darstellung erfolgt wie in Beispiel 4b) beschrieben. Aus 25 g (48,7 mMol) (3-*tert*-Butoxycarbonyl-pentyl)-triphenyl-phosphoniumbromid (Beispiel 7a)) erhält man 7,5 g 7-Pyridin-4-yl-heptansäure-*t*-butylester (65 % d. Th.) als gelbes Öl.

c) 3-[6-(*tert*-Butyloxycarbonyl)hexyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid

Eine Lösung von 5,0 g (19 mMol) 7-Pyridin-4-yl-heptansäure-*t*-butylester in 30 ml Diethylether wird mit 3,6 g (38 mMol) Anilin und anschließend bei 0°C mit einer Lösung von 2,1 g (19 mMol) Bromcyan in 5 ml Diethylether versetzt. Nach 2,5h Rühren bei 0°C wird der entstandene rote Feststoff abfiltriert, mit Äther gewaschen und vakuumgetrocknet. Ausbeute: 8,9 g (91 % d. Th.).

d) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(6-carboxyhexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

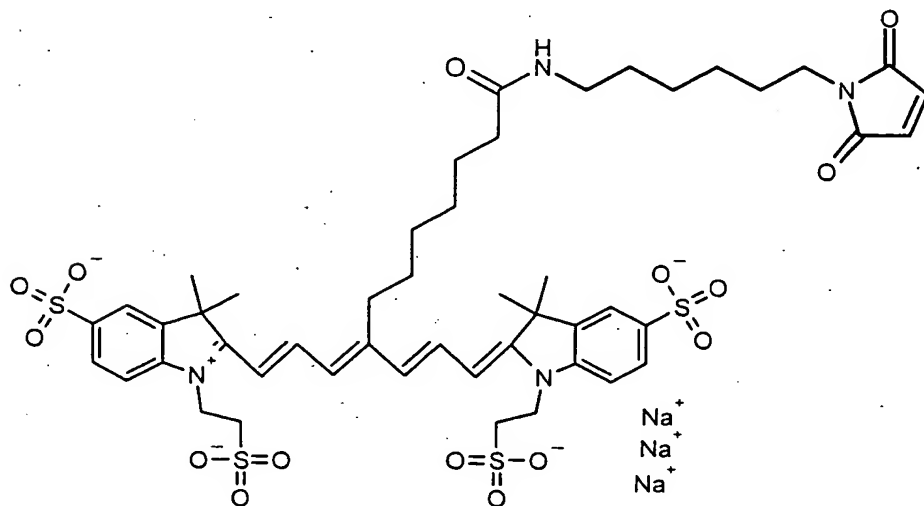
Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1d) aus der Titelverbindung von Beispiel 7c) (3 mMol) und 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (6 mMol). Ausbeute: 1,5 g (54 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

- e) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}hexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,4 g (0,43 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 7d). Ausbeute: 0,31 g (69 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

Elementaranalyse: ber.: C 49,25 H 4,79 N 5,22 S 11,95 Na 6,43
 gef.: C 48,98 H 4,86 N 5,12 S 11,76 Na 6,77

Beispiel 8: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(6-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]carbamoyl}hexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel IX)

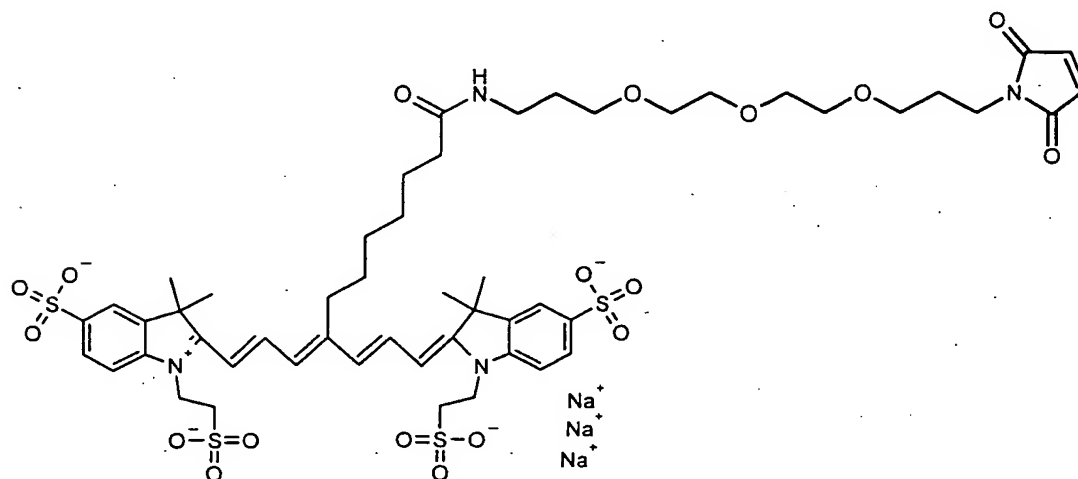


Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,5 g (0,53 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 7d) und 0,23 g (0,75 mMol) N-(6-Aminohexyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,42 g eines blauen Lyophilisats (70 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 51,05 H 5,27 N 4,96 S 11,36 Na 6,11
 gef.: C 50,74 H 5,55 N 4,76 S 11,38 Na 6,35

Beispiel 9: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-

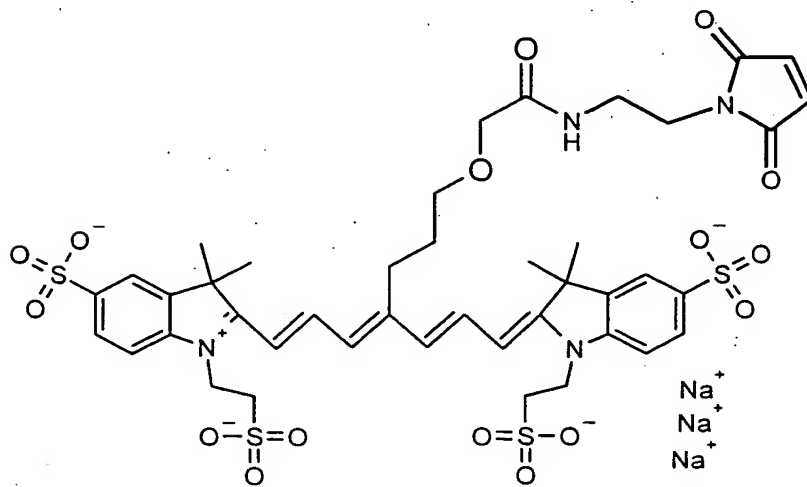
3H-indolium-2-yl]-4-(6-{{13-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,10-trioxatridecyl}carbamoyl}hexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel X)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,5 g (0,53 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 7d) und 0,44 g (1,06 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,24 g eines blauen Lyophilisats (37 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 50,64 H 5,48 N 4,54 S 10,40 Na 5,59
gef.: C 50,30 H 5,56 N 4,34 S 10,15 Na 5,73

Beispiel 10: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-{{2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl}carbamoyl}-3-oxa-pentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XI)



a) 3-Oxa-6-(4-Pyridinyl)hexansäure-*tert*-butylester

Eine Lösung von 75 g (0,4 Mol) 3-(4-Pyridinyl)-1-propanol in 400 ml Toluol / 50 ml THF wird mit 10 g Tetrabutylammoniumsulfat und 350 ml 32 % Natronlauge versetzt. Anschließend wird 123 g (0,68 Mol) Bromessigsäure-*tert*-butylester zugetropft und 18h bei Raumtemp. gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt, die wäßrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel; Laufmittel Hexan:Ethylacetat) erhält man 56 g Produkt (41 % d. Th.) als bräunliches Öl.

b) 3-[4-Oxa-5-(*tert*-Butyloxycarbonyl)pentyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid

Eine Lösung von 5,0 g (20 mMol) 3-Oxa-6-(4-Pyridinyl)hexansäure-*tert*-butylester in 60 ml Diethylether wird mit 3,7 g (40 mMol) Anilin und anschließend bei 0°C mit einer Lösung von 2,2 g (20 mMol) Bromcyan in 8 ml Diethylether versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wird mit 50 ml Diethylether versetzt und der entstandene rote Feststoff abfiltriert, mit Äther gewaschen und vakuumgetrocknet. Ausbeute: 8,5 g (85 % d. Th.) eines violetten Feststoffes.

c) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(6-carboxy-4-oxahexyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

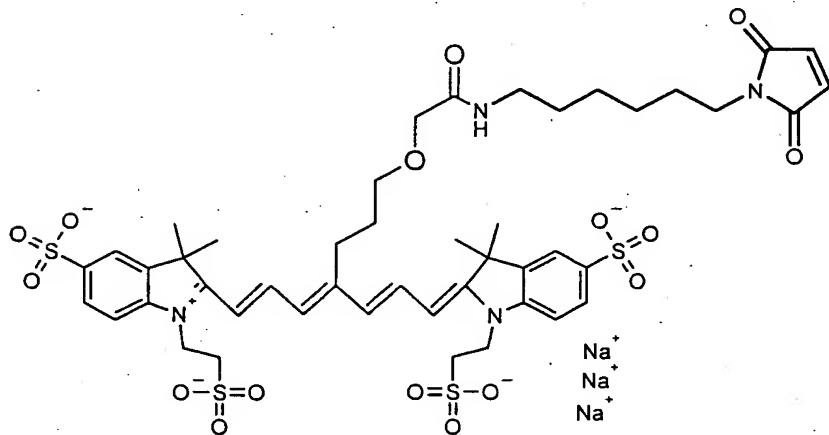
Eine Suspension von 3,0 g (6 mMol) 3-[2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)ethyl]glutaconaldehyd-dianilid-hydrobromid (Beispiel 10b)) und 4,2 g (12 mMol) 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (Beispiel 1a)) in 50 ml Essigsäureanhydrid und 10 ml Essigsäure wird mit 2,5 g (30 mMol) Natriumacetat versetzt und 50 min bei 120°C gerührt. Nach Abkühlen wird mit Diethylether versetzt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, in Aceton ausgerührt und im Hochvakuum getrocknet. Nach chromatographischer Reinigung (RP-C18-Kieselgel, Laufmittel Wasser/Methanol), Entfernung des Methanols im Vakuum und Gefrier-trocknung erhält man direkt die Titelverbindung. Ausbeute: 2,3 g (41 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

d) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}-3-oxapentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 1,0 g (1,1 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 10c). Ausbeute: 0,85 g (73 % d. Th.) eines blauen Lyophilisats.

Elementaranalyse: ber.: C 47,54 H 4,46 N 5,28 S 12,09 Na 6,50
gef.: C 47,97 H 4,65 N 5,10 S 12,02 Na 6,68

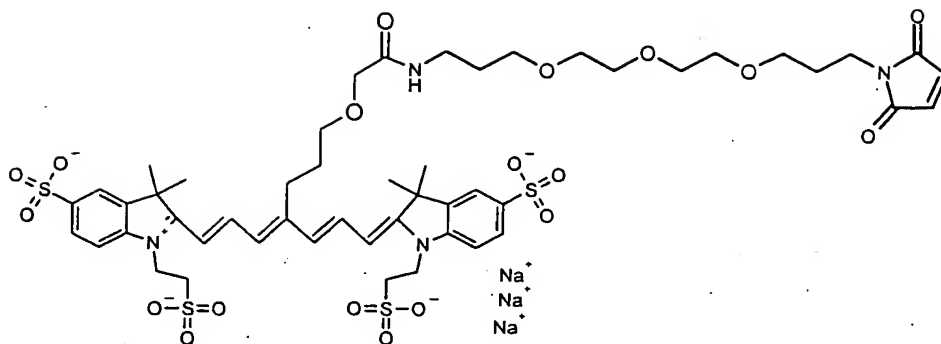
Beispiel 11: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]carbamoyl}-3-oxa-pentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XII)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,5 g (0,55 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 10c) und 0,23 g (0,75 mMol) N-(6-Aminohexyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,42 g eines blauen Lyophilisats (68 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 49,46 H 4,96 N 5,01 S 11,48 Na 6,17
gef.: C 48,95 H 5,21 N 5,22 S 11,23 Na 6,60

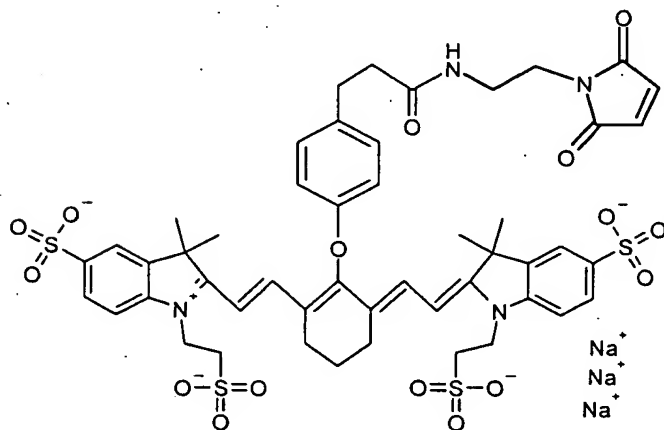
Beispiel 12: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-{[13-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,10-trioxatridecyl]carbamoyl}-4-oxapentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XIII)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,5 g (0,55 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 10c) und 0,46 g (1,06 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,34 g eines blauen Lyophilisats (56 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 49,17 H 5,20 N 4,59 S 10,50 Na 5,65
 gef.: C 49,34 H 5,32 N 4,45 S 10,28 Na 5,56

Beispiel 13: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}ethyl)-phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XIV)



a) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-chlor-cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonat, inneres Salz

5,0 g (14,4 mMol) 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (Beispiel 1a)) und 2,6 g (7,2 mMol) N-[(3-(Anilinomethylen)-2-chloro-1-cyclohexen-1-

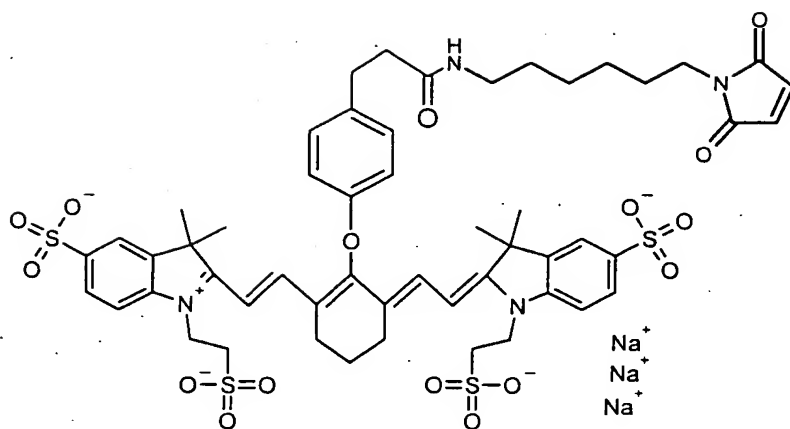
yl)methylen]anilin hydrochlorid (*Fa. Aldrich*) werden zusammen mit 2,5 g (30 mMol) wasserfreiem Natriumacetat in 100 ml Methanol 1h unter Rückfluß erhitzt, abgekühlt, mit 150 ml Diethylether versetzt und über Nacht gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und chromatographisch gereinigt (Kieselgel, Gradient: Dichlormethan/Methanol). Ausbeute: 3,8 g (58 % d. Th.) eines blauen Feststoffs.

b) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-carboxyethyl)phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz
0,37 g (2,2 mMol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure in 30 ml Dimethylformamid werden mit 0,18 g (4,5 mMol) Natriumhydrid (60% Mineralöldispersion) versetzt. Nach 30 min Rühren bei Raumtemp. wird auf 0°C gekühlt, eine Lösung von 2,0 g (2,2 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 12a) in 100 ml Dimethylformamid zugetropft und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Das Gemisch wird mit Trockeneis gequenchet und das Lösungsmittel in Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, mit 200 ml Äther verrührt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Es erfolgt eine chromatographische Reinigung (Kieselgel, Gradient: Ethylacetat/Methanol). Ausbeute: 1,9 g eines blauen Feststoffs (83 % d. Th.).

c) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}ethyl)-phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz
0,1 mg (0,10 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 12b) werden wie in Beispiel 1e) beschrieben mit TBTU und N-(2-Aminoethyl)maleimid-trifluoracetat in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt und das erhaltene Produkt chromatographisch gereinigt. Ausbeute: 93 mg eines blauen Lyophilisats (81 % d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.:	C 51,21	H 4,47	N 4,88	S 11,16	Na 6,00
	gef.:	C 51,50	H 4,55	N 4,95	S 10,93	Na 6,15

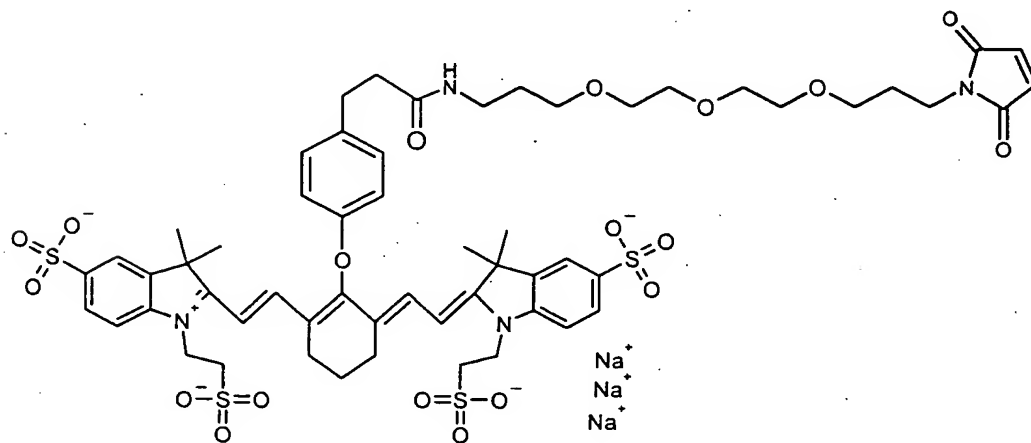
Beispiel 14: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]carbamoyl}ethyl)-phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XV)



Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,7 g (0,68 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 14a) und 0,53 g (1,22 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-trifluoracetat. Ausbeute: 0,56 g eines blauen Lyophilisats (68 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 48,27 H 4,53 N 5,36 S 12,27 Na 6,60
 gef.: C 48,01 H 4,44 N 5,56 S 12,10 Na 6,81

Beispiel 15: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[13-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,10-trioxatridecyl]carbonyl}ethyl)phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XVI)

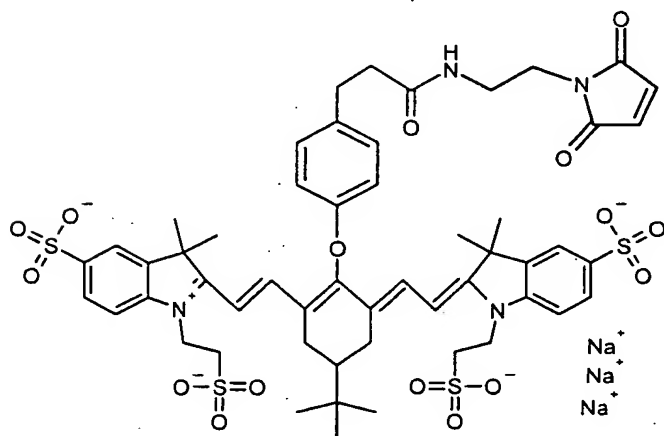


Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,7 g (0,68 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 14a) und 0,59 g (1,36 mMol) N-(13-Amino-4,7,10-trioxatridecyl)maleimid-

trifluoracetat. Es erfolgen zwei chromatographische Reinigungen. Ausbeute: 0,67 g eines blauen Lyophilisats (75 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 52,29 H 5,16 N 4,28 S 9,79 Na 5,27
 gef.: C 51,88 H 5,40 N 4,34 S 9,53 Na 5,68

Beispiel 16: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbonyl}ethyl)-phenoxy]-5-*tert*-butyl-cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XVII)



a) N-[(3-(Anilinomethylen)-2-chlor-5-*tert*-butyl-1-cyclohexen-1-yl)methylen]anilin hydrochlorid

6,7 ml (73,4 mMol) Phosphoroxychlorid werden bei 0°C zu 8 ml Dimethylformamid getropft. Anschließend wird eine Lösung von 5,0 g (32,4 mMol) 4-*tert*-Butylcyclohexanon in 30 ml Dichlormethan zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 h unter Rückfluß gerührt. Nach Abkühlen auf 0°C werden 6 g (64,8 mMol) Anilin in 5,5 ml Ethanol langsam zugetropft, das Gemisch wird auf 200 g Eis gegossen und 5 ml konz. Salzsäure unter Rühren zugefügt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 6,8 g (50 % d. Th.) eines roten Feststoffs.

b) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-chlor-5-*tert*-butylcyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

5,0 g (14,4 mMol) 1-(2-Sulfonatoethyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenin-5-sulfonsäure (Beispiel 1a)) und 3,0 g (7,2 mMol) N-[(3-(Anilinomethylen)-2-chlor-5-*tert*-butyl-1-cyclohexen-1-yl)methylen]anilin hydrochlorid (Beispiel 16a)) werden zusammen mit 2,5 g (30 mMol) wasserfreiem Natriumacetat in 100 ml Methanol 1,5h unter Rückfluß erhitzt, abgekühlt, mit 200 ml Diethylether versetzt und über Nacht gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und chromatographisch gereinigt (Kieselgel, Gradient: Dichlormethan/Methanol). Ausbeute: 4,7 g (68 % d. Th.) eines blauen Feststoffs.

c) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-carboxyethyl)phenoxy]-5-*tert*-butylcyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Umsetzung erfolgt aus der 2,0 g (2,1 mMol) der Titelverbindung von Beispiel 16b) wie in Beispiel 13b) beschrieben. Ausbeute: 1,5 g (66 % d. Th.).

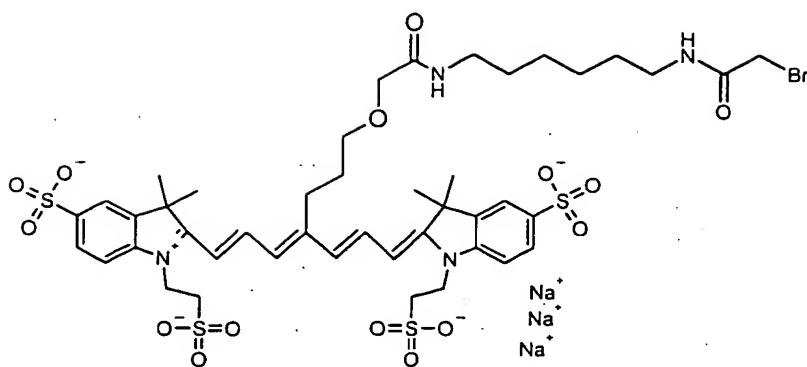
d) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyle}-2-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbonyl}ethyl)-phenoxy]-5-*tert*-butyl-cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Umsetzung erfolgt aus 1,0 g (0,92 mMol) der Titelverbindung von Beispiel 16c) wie in Beispiel 13c) beschrieben. Die chromatographische Reinigung erfolgt zweifach mit RP C-18 Kieselgel (Laufmittel: Acetonitril/Wasser). Ausbeute: 0,24 g (22 % d. Th.).

Elementaranalyse:	ber.:	C 52,82	H 4,93	N 4,65	S 10,64	Na 5,72
	gef.:	C 52,23	H 5,20	N 4,31	S 10,30	Na 6,15

Beispiele 17 - 19: Synthese von Indotricarbocyaninfarbstoffen mit Bromacetylamidgruppen

Beispiel 17: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-{[6-(bromacetylamino)hexyl]carbonyl}-4-oxapentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XIX)



- a) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-((6-aminohexyl)carbamoyl)-4-oxapentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

Die Synthese erfolgt analog zu Beispiel 1e) aus 0,5 g (0,55 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 10c) und 0,15 g (0,70 mMol) N-Boc-Hexandiamin (*Fluka*). Das Reaktionsprodukt wird chromatographisch gereinigt (RP C18-Chromatographie, Gradient: Methanol/Wasser) und nach Gefriertrocknung in 2 ml Trifluoressigsäure / 8 ml Dichloromethan 15 min unter Eiskühlung gerührt. Nach Einrotieren im Vakuum wird der Rückstand in Methanol gelöst, mit Diethylether ausgefällt und isoliert. Ausbeute: 0,26 g eines blauen Feststoffs (41 % d. Th.).

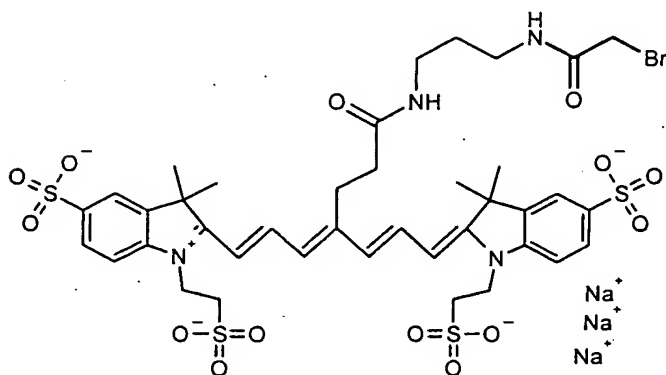
- b) Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(5-[[6-(bromacetyl)amino]hexyl]carbamoyl)-4-oxapentyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz

0,26 g (0,23 mMol) der Titelverbindung aus Beispiel 18a) werden in 5 ml Dimethylformamid auf -20 °C gekühlt, mit 28 mg (0,28 mMol) Triethylamin und einer Lösung von 0,10 g (0,46 mMol) Bromacetyl bromid in 0,2 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 5h Rühren bei maximal 0°C wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt, und durch mehrfaches Umfällen aus Dimethylformamid/Diethylether und anschließender Trocknung gewonnen. Ausbeute: 0,23 g (86 % d. Th.) eines blauen Feststoffs.

Elementaranalyse: ber.: C 45,63 H 4,87 N 4,84 S 11,07 Na 5,96
 gef.: C 45,13 H 4,66 N 4,67 S 10,83 Na n. b.

Beispiel 18: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-{7-[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]-4-(3-[(bromacetyl)amino]propyl]carbamoyl)ethyl)hepta-2,4,6-trien-1-yliden}-1-(2-

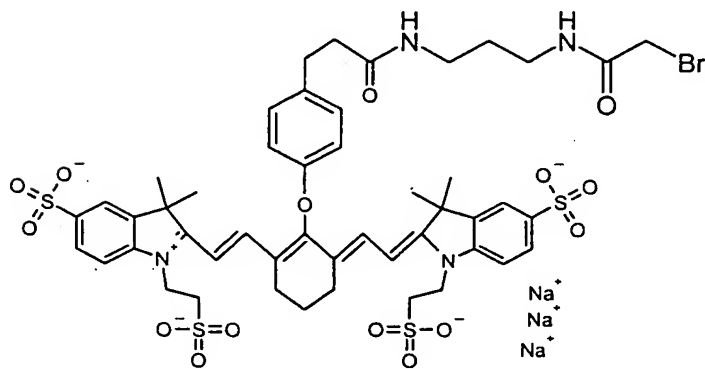
sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XVIII)



Die Synthese erfolgt ausgehend von der Titelverbindung aus Beispiel 1d) (0,5 g; 0,56 mMol) und N-Boc-Propylendiamin analog zu Beispiel 17. Ausbeute über alle Stufen: 0,22 g (37 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 43,70 H 4,33 N 5,23 S 11,96 Na 6,43
gef.: C 43,21 H 4,14 N 5,53 S 10,89 Na n. b.

Beispiel 19: Trinatrium 3,3-dimethyl-2-[2-(1-{[3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(2-sulfonatoethyl)-3H-indolium-2-yl]vinyl}-2-[4-(2-{[3-(bromacetylaminopropyl)carbonyl]ethyl)-phenoxy]cyclohex-1-en-3-yliden)ethyliden]-1-(2-sulfonatoethyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonat, inneres Salz (Formel XX)



Die Synthese erfolgt ausgehend von der Titelverbindung aus Beispiel 13b) (0,5 g; 0,49 mMol) und N-Boc-Propylendiamin analog zu Beispiel 17. Ausbeute über alle Stufen: 0,31 g (53 % d. Th.).

Elementaranalyse: ber.: C 47,88 H 4,52 N 4,65 S 10,65 Na 5,73
gef.: C 48,04 H 4,43 N 4,69 S 10,72 Na 5,84

Beispiele 20 – 23: Synthese von Konjugaten mit Biomolekülen und photophysikalische Charakterisierung der Konjugate

Beispiel 20: Markierung von BSA (bovine serum albumin) mit den Titelverbindungen aus Beispiel 1-16

Allgemeine Vorschrift: Eine Lösung von 5 mg (0,074 μ Mol) BSA (*Fa. Sigma*) in 5 ml Phosphatpuffer (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8) wird mit jeweils 0,74 μ Mol der Titelverbindungen aus Beispiel 1-16 versetzt (Stammlösungen von 0,5 mg/ml in PBS) und 30 min bei 25°C inkubiert. Die Reinigung des Konjugats erfolgt mittels Gelchromatographie (Säule: Sephadex G50, Durchmesser 1,5 cm, Pharmacia, Eluens: PBS).

Beispiel 21: Markierung von BSA mit den Titelverbindungen aus Beispiel 17-19

Allgemeine Vorschrift: Eine Lösung von 5 mg (0,074 μ Mol) BSA (*Fa. Sigma*) in 5 ml Phosphatpuffer (0,1 M Boratpuffer, pH 8,5) wird mit jeweils 1,10 μ Mol der Titelverbindungen aus Beispiel 17-19 versetzt (Stammlösungen von 0,5 mg/ml in PBS) und 5 h bei 25°C inkubiert. Die Reinigung des Konjugates erfolgt mittels Gelchromatographie (Säule: Sephadex G50, Durchmesser 1,5 cm, Pharmacia, Eluens: PBS).

Beispiel 22: Markierung von anti-ED-B-Fibronektin scFv Antikörper AP39 (Single chain fragment) mit den Titelverbindungen aus Beispiel 1-16

AP39 ist ein scFv mit C-terminalem Cystein und liegt als kovalentes S-S-Dimer der Molmasse von ca. 56000 g/Mol vor (Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Mar;5(2):204-13). Durch Reduktion der Disulfidbrücke werden zwei Monomere mit zugänglicher SH-Gruppe erzeugt (Molmasse 28000 g/Mol).

Allgemeine Vorschrift: 0,3 ml einer Lösung von AP39 in PBS (Konz. 0,93 mg Dimer / ml) wird mit 60 μ L einer Lösung von Tris(Carboxyethyl)phosphin (TCEP) in PBS (2,8 mg/ml) versetzt und unter Stickstoff 1 h bei 25°C inkubiert. Überschüssiges TCEP wird mittels Gel-filtration über eine NAP-5-Säule (Eluens: PBS) abgetrennt. Die mittels Photometrie bestimmte Menge an erhaltenem AP39-Monomer ($\text{OD}_{280\text{nm}} = 1,4$) beträgt 230 – 250 μ g (Volumen 0,5 –

0,6 ml). Die Lösung wird mit 0,03 μMol der Titelverbindungen aus Beispiel 1-16 versetzt (Stammlösungen von 0,5 mg/ml in PBS) und 30 min bei 25°C inkubiert. Das Konjugat wird durch Gelchromatographie über eine NAP-5-Säule (Eluens: PBS/10% Glycerin) gereinigt. Die Immunreaktivität der Konjugatlösung wird mittels Affinitätschromatographie (ED-B-Fibronektin-Resin) bestimmt (*J Immunol Meth* 1999, 231, 239). Die Immunreaktivitäten der erhaltenen Konjugate betrug >80% (AP39 vor der Konjugation >95%).

Beispiel 23: Markierung von anti-ED-B-Fibronektin scFv Antikörper AP39 (Single chain fragment) mit den Titelverbindungen aus Beispiel 17-19

Allgemeine Vorschrift: 0,3 ml einer Lösung von AP39 in PBS (Konz. 0,93 mg Dimer / ml) wird mit 60 μL einer Lösung von Tris(Carboxyethyl)phosphin (TCEP) in PBS (2,8 mg/ml) versetzt und unter Stickstoff 1 h bei 25°C inkubiert. Überschüssiges TCEP wird mittels Gel-filtration über eine NAP-5-Säule (Eluens: 50 mM Boratpuffer pH 8,5) abgetrennt. Die mittels Photometrie bestimmte Menge an erhaltenem AP39-Monomer ($\text{OD}_{280\text{nm}} = 1,4$) beträgt 230 – 250 μg (Volumen 0,5 – 0,6 ml). Die Lösung wird 0,06 μMol der Titelverbindungen aus Beispiel 17-19 versetzt (Stammlösungen von 0,5 mg/ml in PBS) und 4 h bei 25°C inkubiert. Das Konjugat wird durch Gelchromatographie über eine NAP-5-Säule (Eluens: PBS/10% Glycerin) gereinigt. Die Immunreaktivität der Konjugatlösung wird mittels Affinitätschromatographie (ED-B-Fibronektin-Resin) bestimmt (*J Immunol Meth* 1999, 231, 239). Die Immunreaktivitäten der erhaltenen Konjugate betrug >75% (AP39 vor der Konjugation >95%).

Photophysikalische Charakterisierung der Farbstoff-BSA-Konjugate aus Beispiel 21 und 22 und der Farbstoff-scFv Antikörper-Konjugate aus Beispiel 23 und 24.

Der Beladungsgrad (molares Verhältnis Farbstoff/Antikörper) wird photometrisch bestimmt und basiert auf einem Extinktionskoeffizienten von 75000 $\text{L Mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ in der kurzwelligen Absorptionsschulter (ca. 690 – 710 nm), der Antikörperabsorption (AP39) mit einer $\text{OD}_{280\text{nm}}$ von 1,4 bzw. der Proteinabsorption (BSA) mit einer $\text{OD}_{277\text{nm}}$ von 0,58. Die Fluoreszenzquantenausbeute wird mit einem SPEX Fluorolog (wellenlängenabhängige Empfindlichkeit von Lampe und Detektor kalibriert) relativ zu Indocyaningrün bestimmt ($Q = 0,13$ in DMSO, *J Chem Eng Data* 1977, 22, 379, *Bioconjugate Chem* 2001, 12, 44).

Tabelle 2: Eigenschaften von erfindungsgemäßen Konjugaten

Substanz (Biomolekül / Beispielverbindung)	Beladungs-	Absorptionsmaximum	Fluoreszenzmaximum (nm)	Fluoreszenzquantenaus-
--	------------	--------------------	-------------------------	------------------------

	Titelverbindung aus Beispiel 6				
K14	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 7	1,0	769	792	n. b.
K15	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 10	1,1	767	790	0,13
K16	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 11	1,1	767	789	0,15
K17	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 12	0,9	766	790	0,11
K18	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 13	1,2	771	795	0,10
K19	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 14	1,1	772	796	0,09
Beispiel 23					
K20	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 17	0,7	767	790	0,18
K21	Konjugat aus AP39 und der Titelverbindung aus Beispiel 19	0,8	773	794	0,13

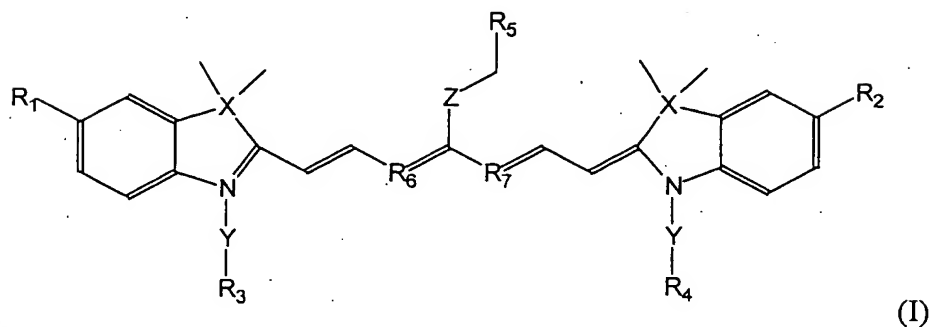
Beispiel 24:

Die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Konjugate wurden *in vivo* nach Injektion in tumortragende Nacktmäuse untersucht. Dazu wurden die Konjugate intravenös appliziert und die Anreicherung in der Tumorregion in einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden beobachtet. Die Fluoreszenz der Substanzen wurde durch flächige Bestrahlung der Tiere mit Nahinfrarot-Licht der Wellenlänge 740 nm, das mit einer Laserdiode (0,5 W Leistung) erzeugt wurde, angeregt. Die Fluoreszenzstrahlung wurde durch eine intensivierte CCD-Kamera detektiert und die Fluoreszenzbilder digital gespeichert. In Figur 2 ist anhand eines Beispiels

die *in-vivo*-Wirksamkeit der Farbstoff-Konjugate dargestellt.

Patentansprüche

1. Indotricarbocyaninfarbstoff der allgemeinen Formel (I),

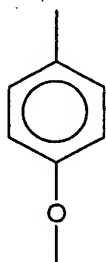


worin

X O, S oder zweifach substituiertes C ist, wobei die Substituenten ausgewählt sein können aus Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl und/oder Butyl,

Y CH₂-CH₂ oder CH₂-CH₂-CH₂ ist,

Z C₁ bis C₅ Alkyl ist, wobei die C-Atome gegebenenfalls durch O oder S substituiert sind oder



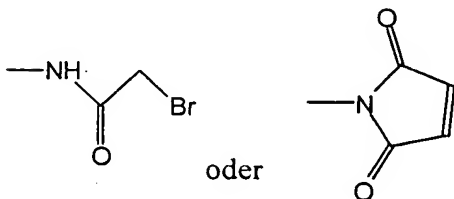
ist,

R₁ bis R₄ unabhängig voneinander SO₃H oder H sind, mit der Voraussetzung, daß mindestens drei von R₁ bis R₄ SO₃H sind,

R₅ -CO-NH-R₈-R₉, -NH-CS-NH-R₈-R₉ oder -NH-CO-R₈-R₉ ist,

worin R₈ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus unverzweigtem C₂-C₁₃ Alkyl, in dem gegebenenfalls C-Atome durch O oder S ersetzt sind, und

R₉ ausgewählt ist aus



oder Chloracetyl, Bromacetyl, Iodacetyl, Chloracetamido, Iodacetamido, Chloralkyl, Bromalkyl, Iodalkyl, Pyridyldisulfid und Vinylsulfonamid, und worin R_6 und R_7 CH ist oder durch ein C_3 -Alkyl zu einem Hexylring verbunden sind, der gegebenenfalls in para-Position mit einem C_1 bis C_4 -Alkylrest substituiert sein kann, und Salze und Solvate dieser Verbindung.

2. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 1, worin

Y CH_2-CH_2 ist,

Z C_1 bis C_5 Alkyl ist, wobei die C-Atome gegebenenfalls durch O oder S substituiert sind, und

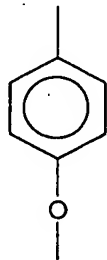
worin R_6 und R_7 CH ist, und Salze und Solvate dieser Verbindung.

3. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 1 oder 2, worin

Z C_1-C_5 Alkyl ist.

4. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 1 oder 2, worin

Z

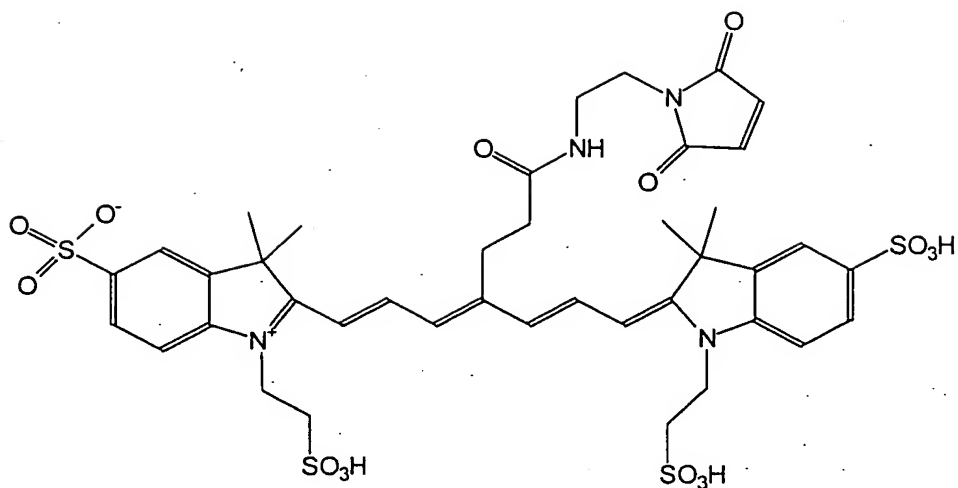


ist, und R_6 und R_7 über C_3 -Alkyl zu einem Hexylring verbunden sind.

5. Indotricarbocyaninfarbstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin

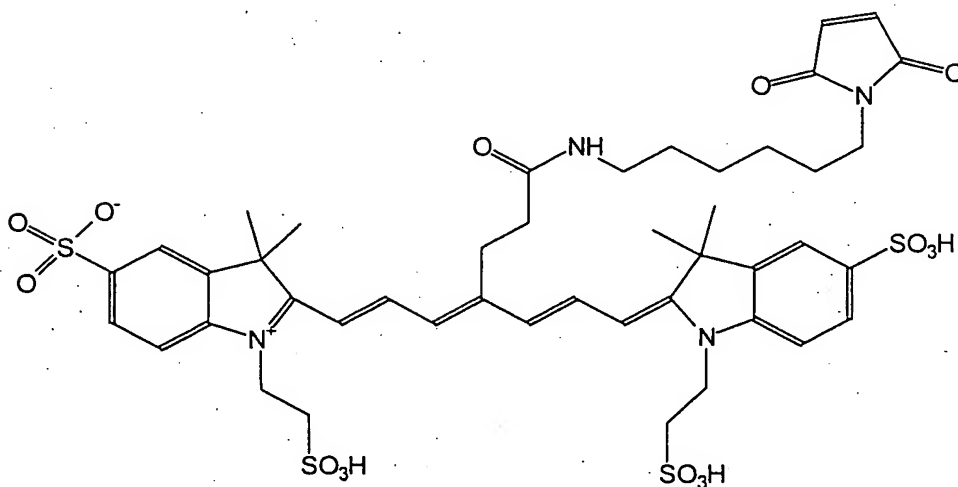
R_5 $COOH$ oder NH_2 ist.

6. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (II)



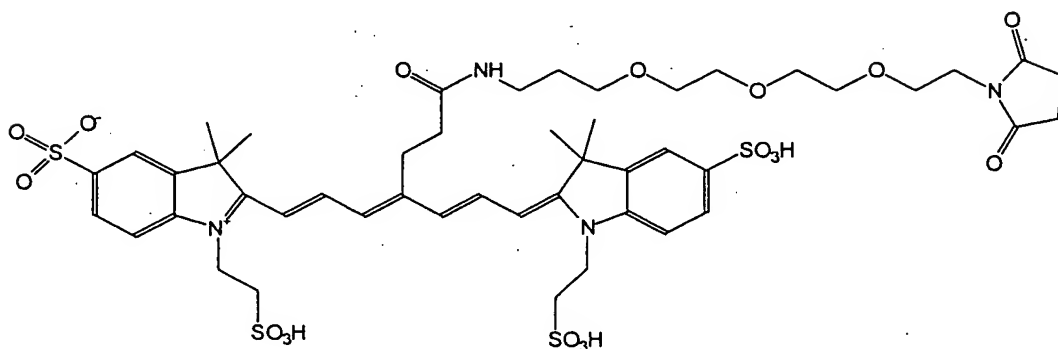
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

7. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (III)



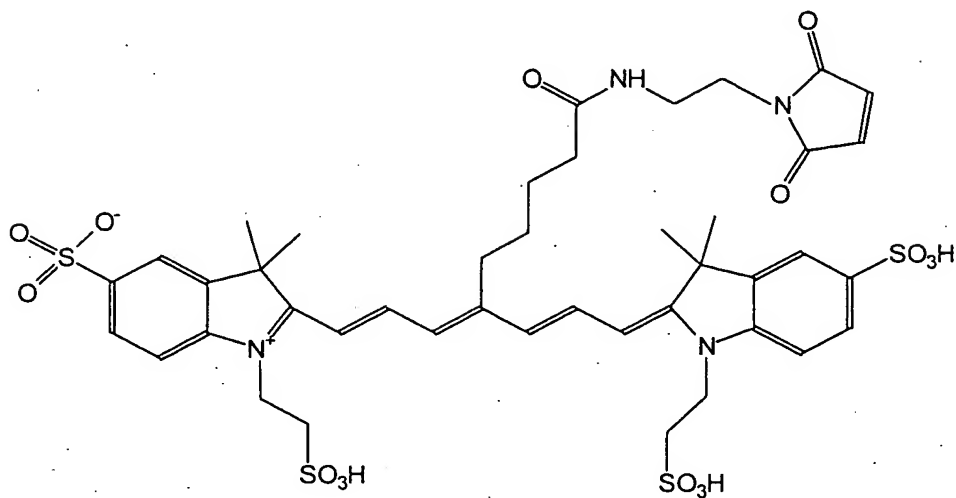
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

8. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (IV)



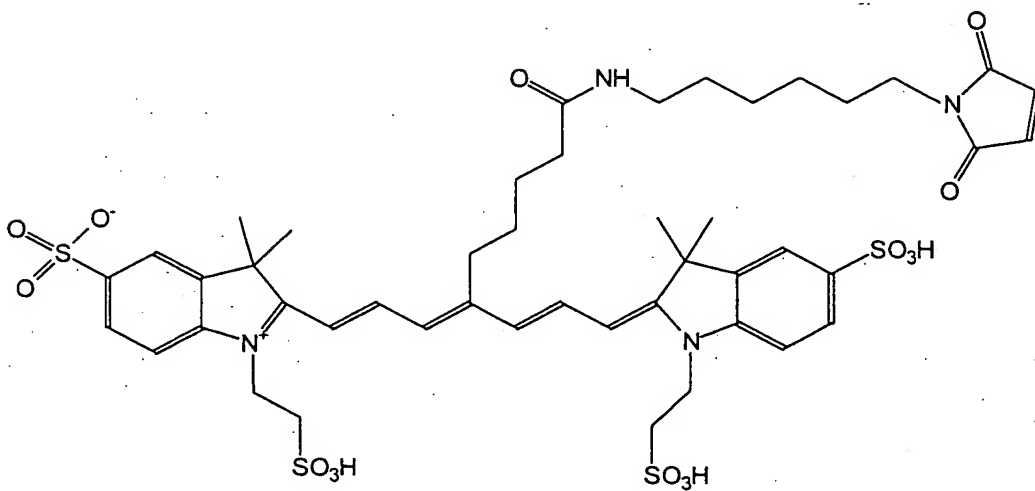
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

9. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (V)



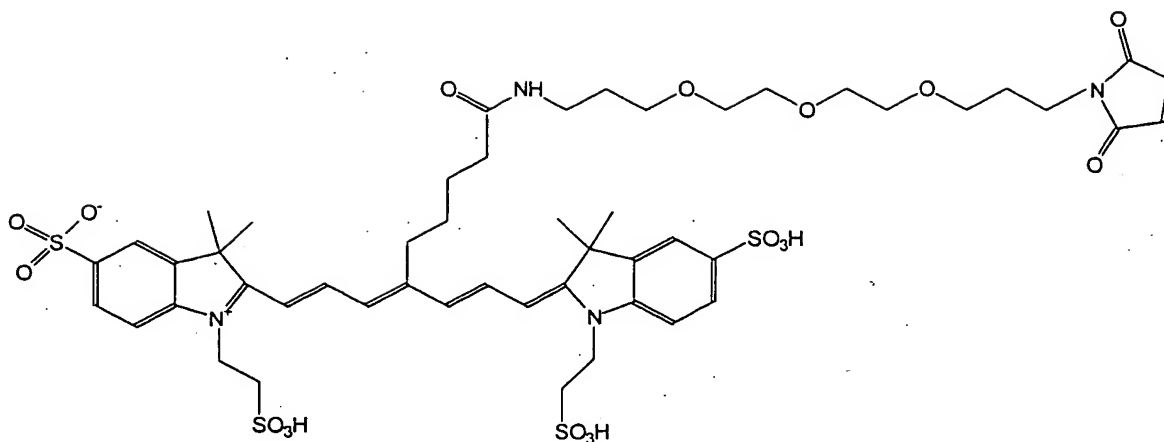
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

10. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (VI)



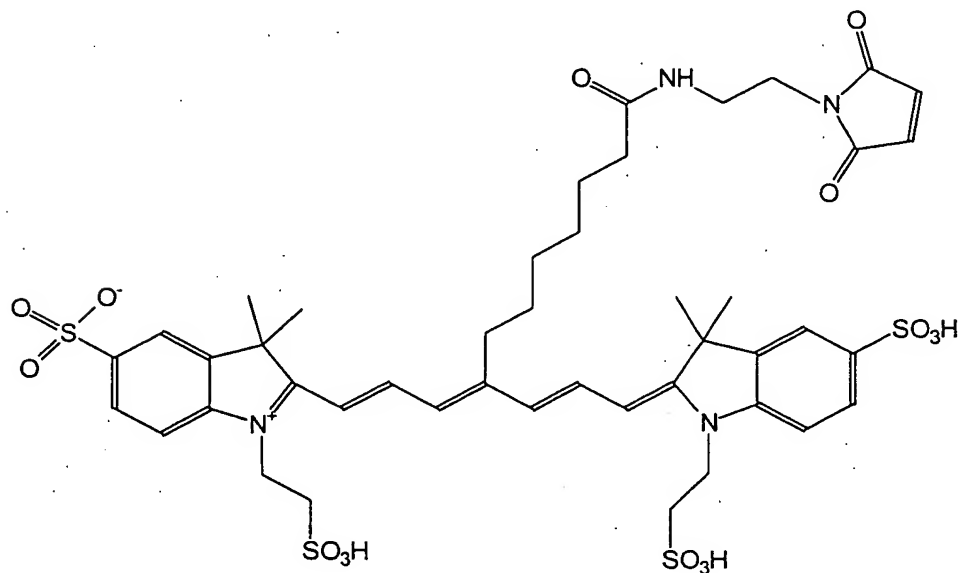
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

11. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (VII)



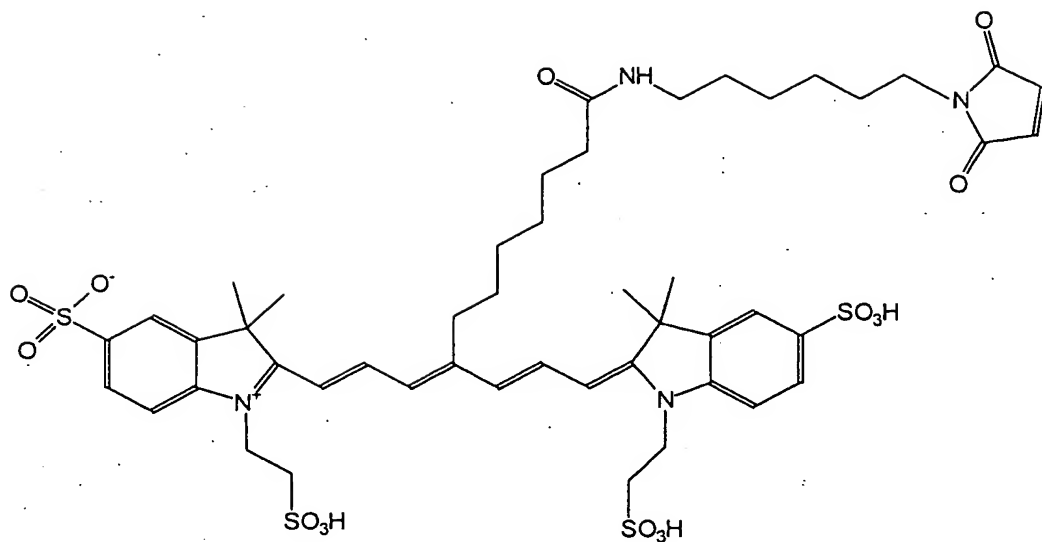
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

12. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (VIII)



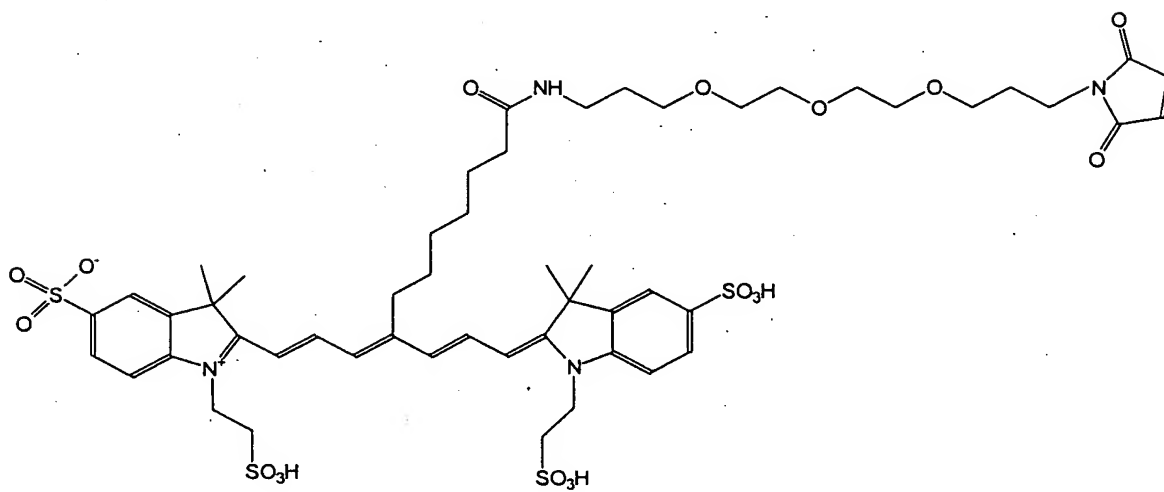
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

13. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (IX)



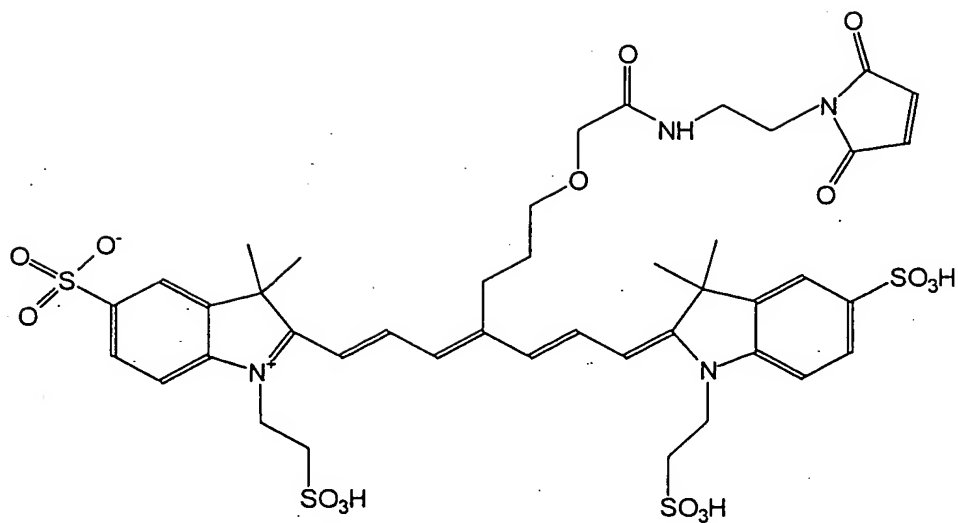
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

14. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (X)



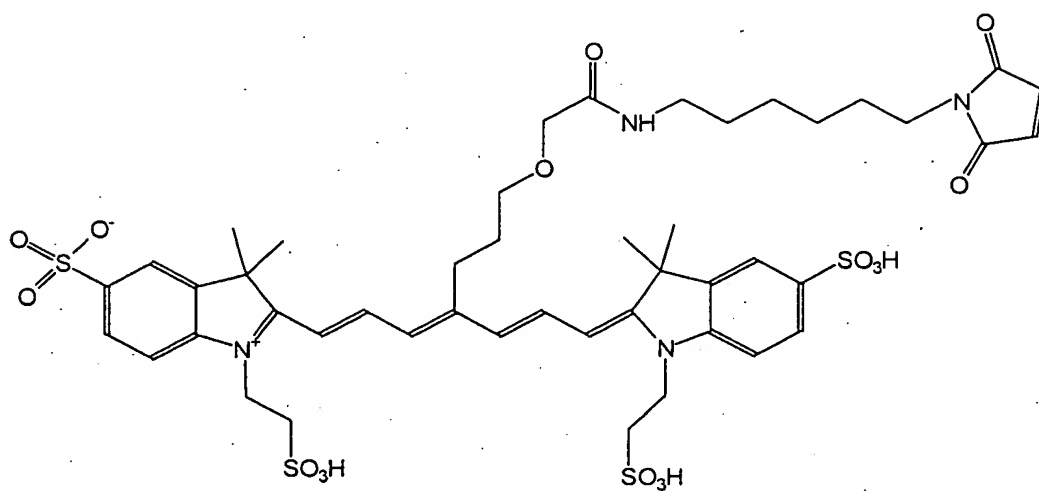
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

15. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 2 der Formel (XI)



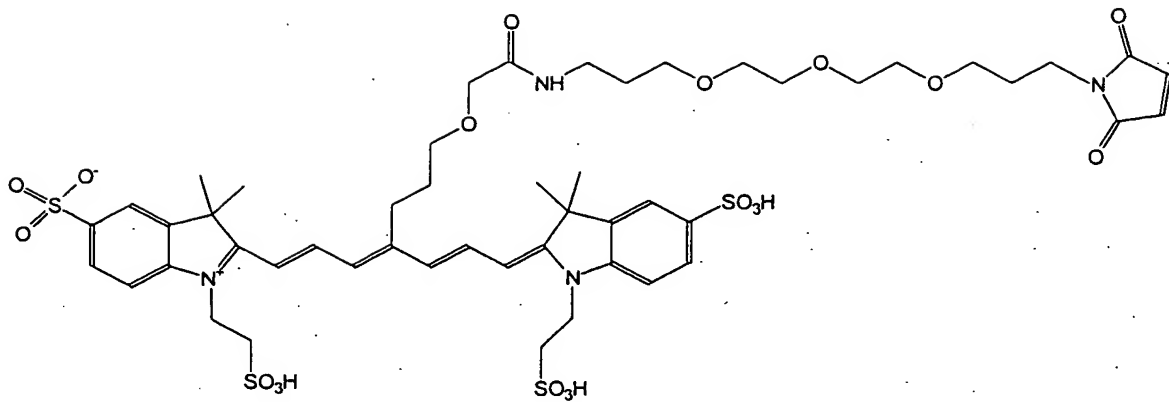
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

16. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 2 der Formel (XII)



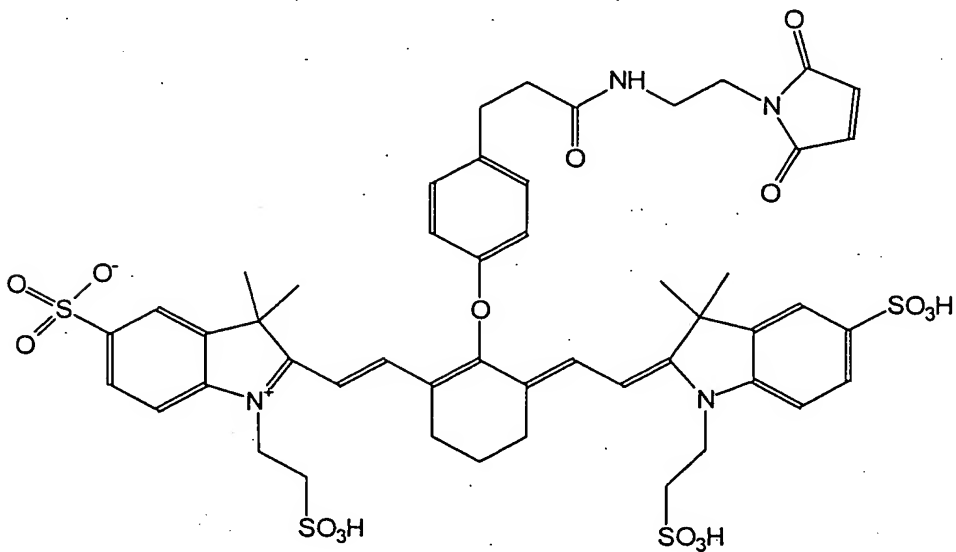
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

17. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 2 der Formel (XIII)



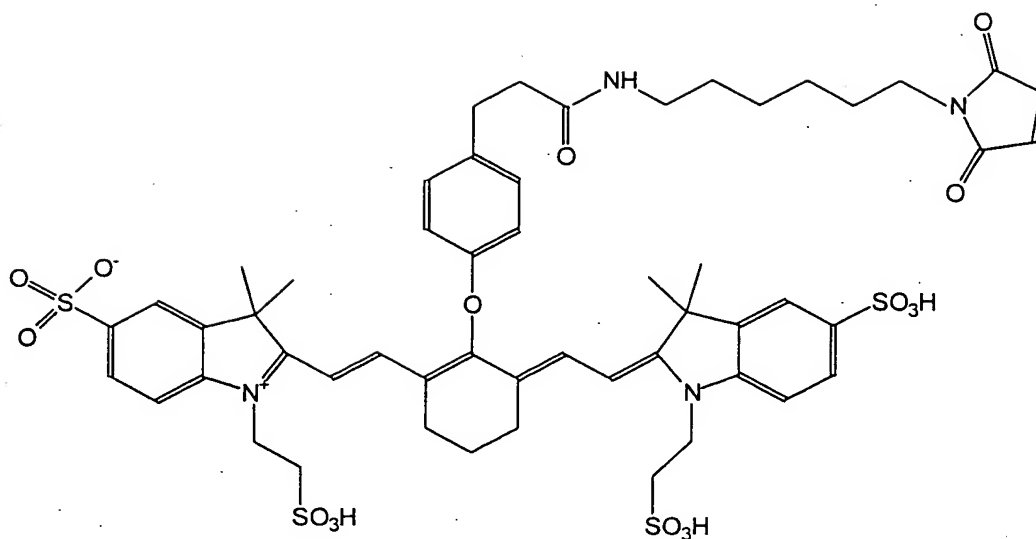
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

18. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 4 der Formel (XIV)



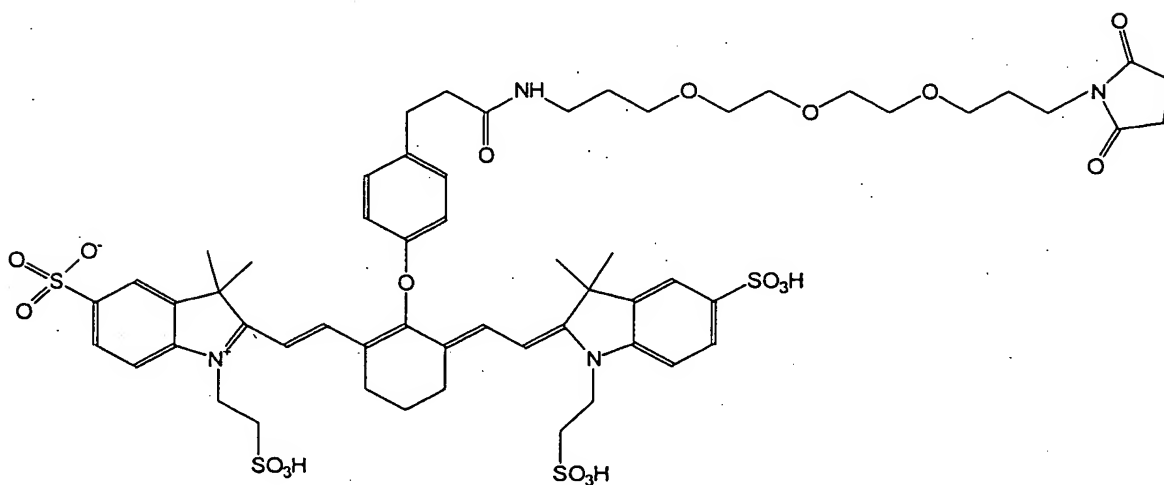
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

19. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 4 der Formel (XV)



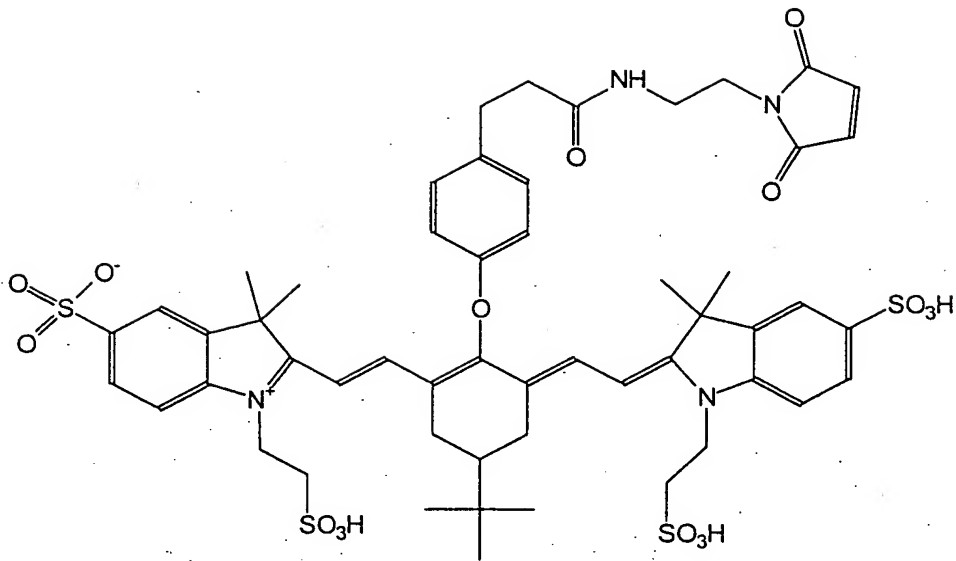
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

20. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 4 der Formel (XVI)



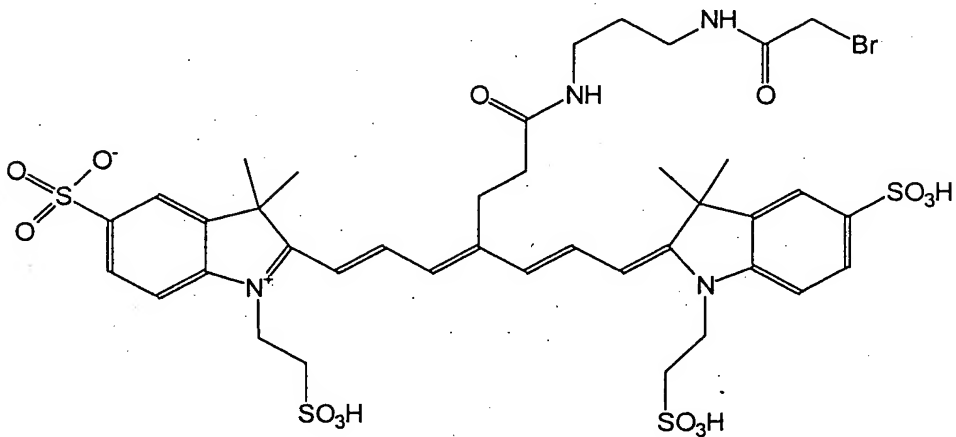
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

21. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 4 der Formel (XVII)



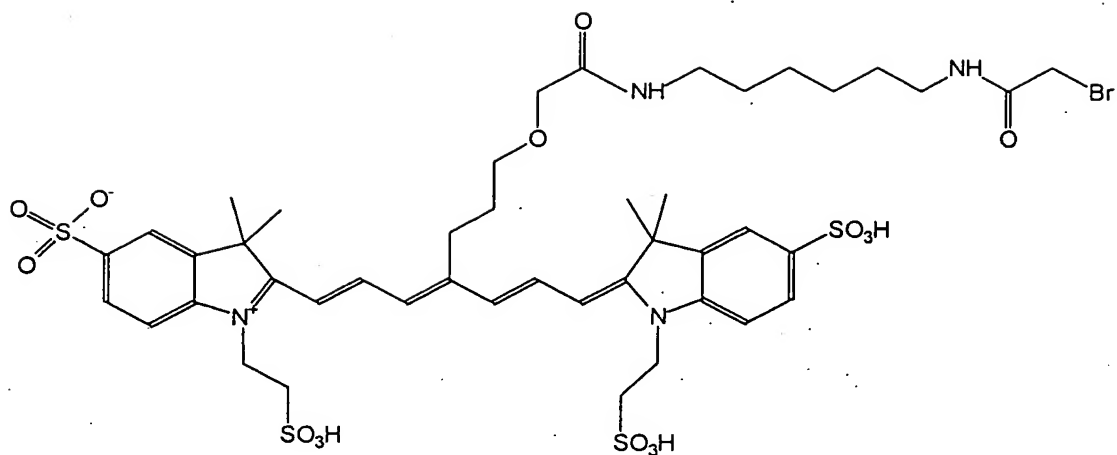
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

22. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 3 der Formel (XVIII)



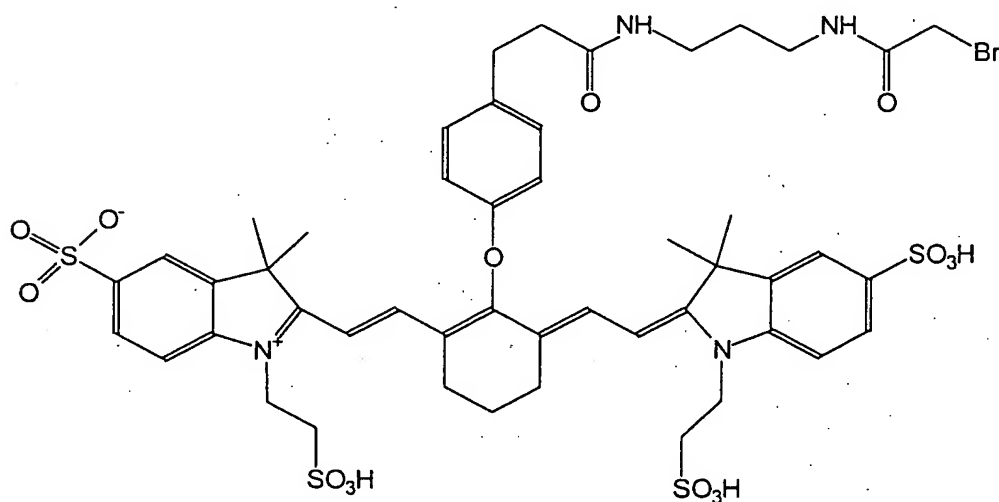
und Salze und Solvate dieser Verbindung.

23. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 2 der Formel (XIX)



und Salze und Solvate dieser Verbindung.

24. Indotricarbocyaninfarbstoff nach Anspruch 4 der Formel (XX)



und Salze und Solvate dieser Verbindung.

25. Verfahren zur Herstellung eines Indotricarbocyaninfarbstoffs nach einem der Ansprüche 1 bis 24, umfassend

- Bereitstellen von einem oder mehreren 4-substituierten Pyridinen,
- Überführen des einem oder mehreren 4-substituierten Pyridine in *meso*-substituierte Glutaconaldehyd-dianilide als Vorstufen zu Cyaninfarbstoffen, mittels der Zincke-König-Reaktion, und
- Erhalten der *meso*-substituierte Glutaconaldehyd-dianilide als Vorstufen zu Cyaninfarbstoffen.

26. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats, umfassend Koppeln eines Indotricarbocyaninfarbstoffs nach einem der Ansprüche 1 bis 24 mit einem Biomolekül.

27. Konjugat eines Indotricarbocyaninfarbstoffs mit einem Biomolekül, hergestellt nach Anspruch 26.

28. Konjugat nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es als Biomolekül mindestens ein Biomolekül, ausgewählt aus Peptiden, Proteinen, Lipoproteinen, Antikörpern oder Antikörperfragmenten, Nukleinsäuren, wie zum Beispiel Oligo- oder Polynukleotiden aus DNA oder RNA, Aptameren, PNA, und Zuckern, wie zum Beispiel Mono-, Di-, Tri-, Oligo- und Polysacchariden umfaßt.

29. Konjugat nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ausgewählt aus ist der Gruppe von Strukturproteinen oder löslichen Proteinen des Körpers.

30. Konjugat nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche Protein ein Serumprotein, wie zum Beispiel HSA, BSA, Ovalbumin, ein Enzym, wie zum Beispiel eine Peroxidase oder ein Antikörper, ein scFv-Fragment oder F(ab) ist.

31. Konjugat nach einem der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche Protein eine Affinität gegen ED-B-Fibronektin aufweist.

32. Konjugat nach einem der Ansprüche 27 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Indotricarbocyaninfarbstoff über eine SH-Gruppe, insbesondere über eine SH-Gruppe an einem Cystein, an das Biomolekül gekoppelt wird.

33. Diagnostischer Kit, umfassend einen Indotricarbocyaninfarbstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 24 und/oder ein Konjugat nach einem der Ansprüche 27 bis 31, zusammen mit weiteren Hilfsmitteln zur Durchführung einer *in vivo* Diagnostik von insbesondere Tumoren.

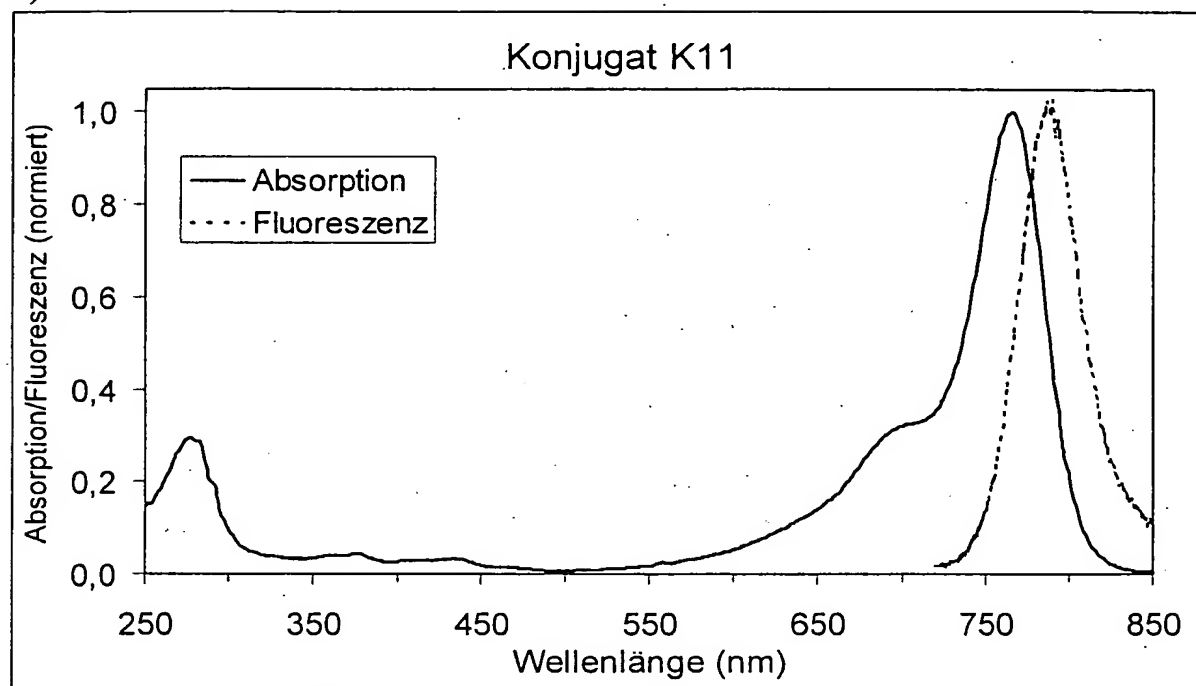
34. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 27 bis 31 als Fluoreszenzkontrastmittel für die *in vivo* Diagnostik von Tumoren.

Zusammenfassung

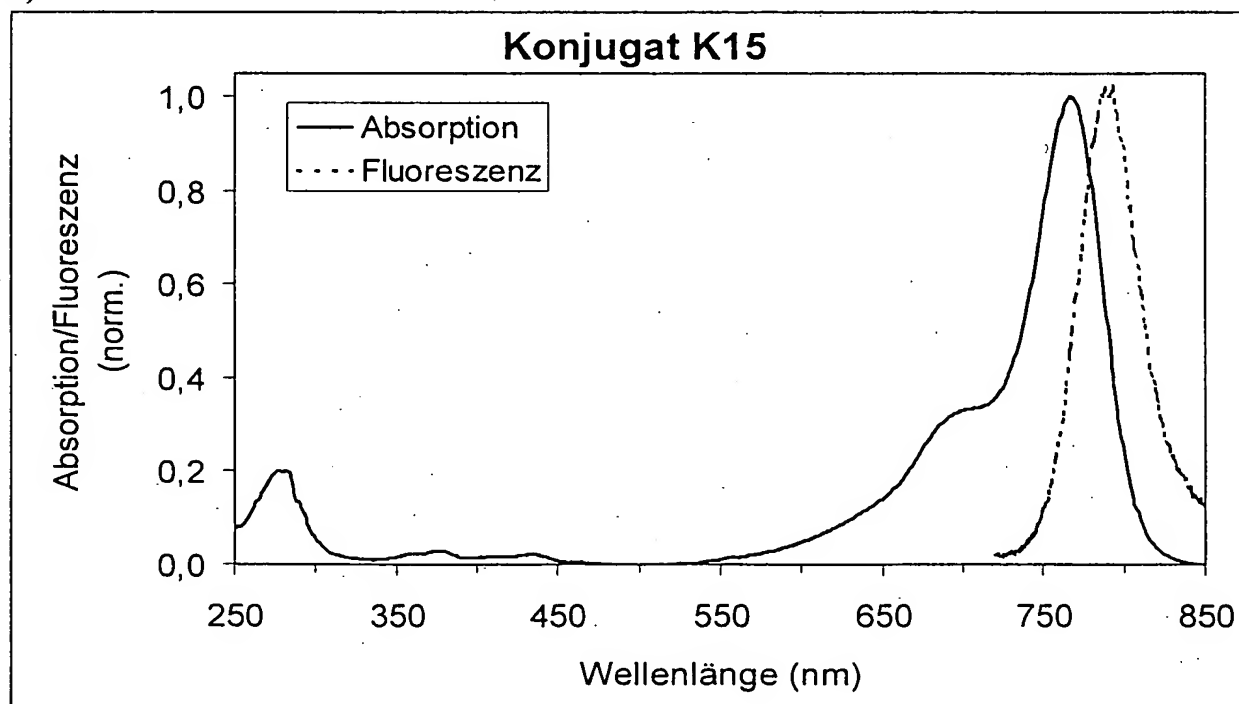
Die vorliegende Erfindung betrifft neue Fluoreszenzfarbstoffe aus der Klasse der Cyaninfarbstoffe, im speziellen Indotricarbocyanine mit einem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Spektralbereich 700 bis 900 nm, einer Thiol-spezifischen reaktiven Gruppe und drei, vorzugsweise vier Sulfonatgruppen, zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit sowie die Herstellung der Farbstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Konjugate dieser Farbstoffe mit BioMolekülen und deren Verwendungen.

Figur 1

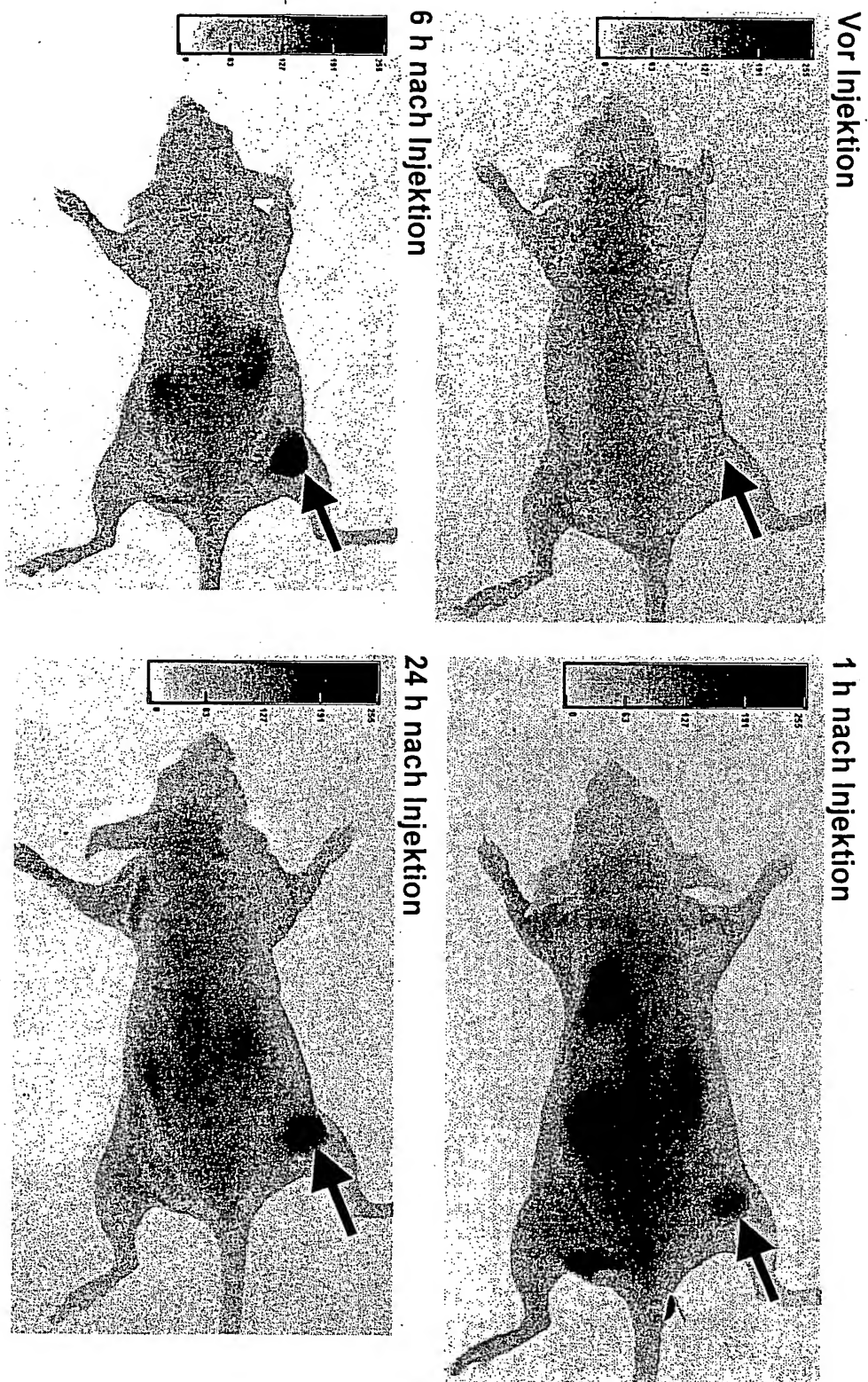
A)



B)



Figur 2





Creation date: 01-28-2004

Indexing Officer: ARAHMANYAR—ABDUL RAHMANYAR

Team: OIPEScanning

Dossier: 10761680

Mary

Legal Date: 01-20-2004

No.	Doccode	Number of pages
1	TRNA	2
2	SPEC	30
3	CLM	7
4	ABST	1
5	DRW	4
6	OATH	4
7	IDS	4
8	NPL	27
9	NPL	14
10	NPL	29
11	NPL	9
12	NPL	24
13	NPL	20
14	NPL	9
15	NPL	4
16	NPL	4
17	NPL	8
18	NPL	3
19	NPL	9
20	NPL	6
21	NPL	12
22	NPL	5
23	NPL	5
24	WFEE	1
25	WFEE	1

Total number of pages: 242

Remarks:

Order of re-scan issued on